

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 22 July 1999 (22.07.99)	
International application No.: PCT JP99 00109	Applicant's or agent's file reference: F 3540 PT
International filing date: 14 January 1999 (14.01.99)	Priority date: 19 January 1998 (19.01.98)
Applicant: TATSUMI, Yoko et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
19 May 1999 (19.05.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ *ad hoc*

in accordance with the provisions of Article 17 of the Treaty, and the designated Office is hereby notified of its election made



# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Australian Patent Office  
P.O. Box 200  
Woden, ACT 2606  
AUSTRALIE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 22 July 1999 (22.07.99)	
International application No.: PCT JP99 00109	Applicant's or agent's file reference: F 3540 PT
International filing date: 14 January 1999 (14.01.99)	Priority date: 19 January 1998 (19.01.98)
Applicant: TAKARA SHUZO CO., LTD.	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
19 May 1999 (19.05.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ without

any payment of the supplementary fee provided for in Article 17, paragraph 2, of the Regulations under the Treaty, and the fee for the election of the designated Office.





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00109

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22,  
C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22,  
C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/21443, A1 (Balazovsky, Mark Borisovich; Kozhemyakin, Leonid Andreevich), 19 June, 1997 (19. 06. 97) & WO, 97/21444, A1 & EP, 869809, A1	1-15
PX	WEENEN, Hugo; Van Der VEN, Jos G. M.; Van Der LINDE, Leendert M.; Van DUYNHOVEN, John; GROENEWEGEN, Anneke, "C4, C5, and C6 3-deoxyglycosones: structures and reactivity", Spec. Publ. - R. Soc. Chem. 1998, 223 (Maillard Reaction in Foods and Medicine), p.57-64	11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other

document (e.g., a specification)

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

Date of the actual completion of the international search:

13 April, 1999 (13. 04. 99)

Date of mailing of the international search report:

27 April, 1999 (27. 04. 99)

Examiner's Name

Examiner's Name



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07C17/263, C07C19/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07C17/263, C07C19/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	W0, 97/21443, A1 (Balazovsky, Mark Borisovich; Kozhemyakin, Leonid Andreevich) 19. 6 月. 1997 (19. 06. 97) & W0, 97/21444, A1 & EP, 869809, A1	1 ~ 15
P X	WEENEN, Hugo; Van Der VEN, Jos G. M.; Van Der LINDE, Leendert M.; Van DUYNHOVEN, John; GROENEWEGEN, Anneke, "C4, C5, and C6 3-deoxyglycosones: structures and reactivity", Spec. Publ. - R. Soc. Chem. 1998, 223 (Maillard Reaction in Foods and Medicine), p. 57-64	11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せに

27.04.99



# Translation

## PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F 3540 PT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA 416)	
International application No PCT/JP99/00109	International filing date (day month year) 14 January 1999 (14.01.99)	Priority date (day month year) 19 January 1998 (19.01.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07C 47 263, 49 707, 45 52, 45 59, 323 22, C07D 473 18, 473 34, A23L 1 30, 2 00, A61K 31 12, 31 52, A61P 43 00		
Applicant TAKARA SHUZO CO., LTD.		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

- This report contains indications relating to the following items.

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☐ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

At May 1999, in \_\_\_\_\_

At January 1999, in \_\_\_\_\_

Signature of the International Preliminary Examining Authority

Signature of the Applicant



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT JP99 00109

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application \*

- ☐ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
page \_\_\_\_\_, as originally filed  
page \_\_\_\_\_, filed with the demand  
page \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
page \_\_\_\_\_, as originally filed  
page \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
page \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of☐ \_\_\_\_\_

\* The elements of the international application are indicated in the Supplementary International Search Report.

\* The elements of the international application are indicated in the Supplementary International Search Report.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT JP99 00109

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 F 3540 PT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/00109	国際出願日 (日.月.年) 14.01.99	優先日 (日.月.年) 19.01.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl. <sup>7</sup> C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52, A61P43/00		
出願人 (氏名又は名称)  寶酒造株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

特許庁長官宛

日本国特許庁 (IPEA J P)

郵便番号100-8915

〒100-8915 東京都千代田区霞が関1-1-1

特許庁長官宛 権限のある職員

本署 総務

印



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性（N）

請求の範囲 1～15 有  
請求の範囲 無

進歩性（IS）

請求の範囲 1～15 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性（IA）

請求の範囲 1～15 有  
請求の範囲 無

2. 文献及び説明（PCT規則70.7）





PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F 3540 PT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/00109	国際出願日 (日.月.年) 14. 01. 99	優先日 (日.月.年) 19. 01. 98
出願人(氏名又は名称) 寶酒造株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する

6. 要約書(第I欄に示される)は、

第 \_\_\_\_\_ 頁から \_\_\_\_\_ 頁まで、出願人が承認したものを承認する

☒ 第 \_\_\_\_\_ 頁から \_\_\_\_\_ 頁まで、国際調査機関が作成したものを承認する

7. 発明の名称は、第 \_\_\_\_\_ 頁から \_\_\_\_\_ 頁まで、出願人が承認したものを承認する



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/21443, A1 (Balazovsky, Mark Borisovich; Kozhemyakin, Leonid Andreevich) 19.6月.1997(19.06.97) &WO, 97/21444, A1 &EP, 869809, A1	1 ~ 15
P X	WEENEN, Hugo; Van Der VEN, Jos G. M.; Van Der LINDE, Leender t M.; Van DUYNHOVEN, John; GROENEWEGEN, Anneke, "C4, C5, and C6 3-deoxyglycosones: structures and reactivity", Spec. Publ. - R. Soc. Chem. 1998, 223 (Maillard Reaction in Foods and Medicine), p. 57-64	11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せに

国際調査機関: 特許庁 (特許審判部)

特許庁審査官 (権限付与職員)





# 特許協力条約に基づく国際出願

## 願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	14.01.99
出願人又は代理人の書類番号 (希望する場合は、最大12字)	14.1.99 E 540 PT

### 第 I 欄 発明の名称

アボトーシス誘発能を有する物質

### 第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

寶酒造株式会社

Takara Shuzo Co., Ltd.

〒612-8061 日本国京都府京都市伏見区竹中町609番地

609, Takenaka-cho, Fushimi-ku, Kyoto-shi,  
Kyoto 612-8061 Japan

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

077-543-7204

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

### 第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

異 容 子

TATSUMI Yoko

〒520-2193 日本国滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号

寶酒造株式会社 中央研究所内

c/o Central Research Laboratories,  
Takara Shuzo Co., Ltd.,  
4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi,  
Shiga 520-2193 Japan

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続表に記載されている。

### 第 IV 欄 代理人又は特許代理人の代表者、通知のあて名

10661 代理人 安 達 智 ADATI Satoshi

10661 弁理士 風 早 信 昭 KAZAHAYA Nobuaki

10661 代理人 安 達 智 ADATI Satoshi  
10661 弁理士 風 早 信 昭 KAZAHAYA Nobuaki  
10661 代理人 安 達 智 ADATI Satoshi  
10661 弁理士 風 早 信 昭 KAZAHAYA Nobuaki



この欄に記入しないときは、この用紙を簡潔に含めたいこと。 氏名（姓名）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 佐川 裕章 SAGAWA Hiroaki 〒520-2193 日本国滋賀県大津市瀬田 3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 c/o Central Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd., 4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi, Shiga 520-2193 Japan		この欄に記載した者は、次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 （ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）
国籍（国名）： 日本国 JAPAN	住所（国名）： 日本国 JAPAN	
この欄に記載した者は、次の指定国について出願人である： <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国 氏名（姓名）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 大野 宏 OHNOGI Hiromu 〒520-2193 日本国滋賀県大津市瀬田 3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 c/o Central Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd., 4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi, Shiga 520-2193 Japan		この欄に記載した者は、次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 （ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）
国籍（国名）： 日本国 JAPAN	住所（国名）： 日本国 JAPAN	
この欄に記載した者は、次の指定国について出願人である： <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国 氏名（姓名）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 小林 英二 KOBAYASHI Eiji 〒520-2193 日本国滋賀県大津市瀬田 3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 c/o Central Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd., 4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi, Shiga 520-2193 Japan		この欄に記載した者は、次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 （ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）
国籍（国名）： 日本国 JAPAN	住所（国名）： 日本国 JAPAN	
この欄に記載した者は、次の指定国について出願人である： <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国 氏名（姓名）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載） 務 華 康 WU Hua-Kang		この欄に記載した者は、次に該当する： <input type="checkbox"/> 出願人のみである。

Takara Shuzo Co., Ltd.,  
 4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi,  
 Shiga 520-2193 Japan





この欄に記載した者は、次の指定国に属する者であること。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

小 山 信 人 KOYAMA Nobuto

〒520-2193 日本国滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号

寶酒造株式会社 中央研究所内

c/o Central Research Laboratories,  
Takara Shuzo Co., Ltd.,  
4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi,  
Shiga 520-2193 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

猪 飼 勝 重 IKAI Katsushige

〒520-2193 日本国滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号

寶酒造株式会社 中央研究所内

c/o Central Research Laboratories,  
Takara Shuzo Co., Ltd.,  
4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi,  
Shiga 520-2193 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

加 藤 郁之進 KATO Ikunoshin

〒520-2193 日本国滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号

寶酒造株式会社 中央研究所内

c/o Central Research Laboratories,  
Takara Shuzo Co., Ltd.,  
4-1, Seta 3-chome, Otsu-shi,  
Shiga 520-2193 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。



## 第Ⅴ欄 国名(国名)

規則 4.9(a)の 記号及び記号の指定を行う (該当する□に印を付すこと： 少なくとも1つの□に印を付すこと)。

以下に記号を付す

- ☐ AP ARIPO 半信符 : GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブ웨 Zimbabwe, 及びパラグワイと特許協力条約締結国である他の国
- ☒ EA エウラシア半信符 : AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドバ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びエウラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ EP エーロピア半信符 : AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びエーロピア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ OA OAPI 半信符 : BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボワール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, ML マリ Mali, MR モリタニア Mauritania, NI ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の国名は必要又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

(国)内半信符 (記号の指定又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania                                       | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania   |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia                                       | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria                                      | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia                        | <input type="checkbox"/> MD モルドバ Republic of Moldova                                    |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan                                 | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar   |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados                                      | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia   |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria                                      | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi   |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil   | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico   |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus                                       | <input type="checkbox"/> NO ノルウェー Norway  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada                               | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ゼーランド New Zealand                                       |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China                                 | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal  |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba   | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania   |
| <input type="checkbox"/> CZ チェコ Czech Republic                                  | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation                                      |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany   | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan  |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark                                       | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden   |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia                                       | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain  | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland                                      | <input type="checkbox"/> SK スロバキア Slovakia  |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom                                   | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input type="checkbox"/> GE ジョージア Georgia                                       | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana   | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia   | <input type="checkbox"/> TR トルキー Turkey   |
| <input type="checkbox"/> GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau                               | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia                                       | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary                                       | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda   |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia                                    | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America                      |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel  | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland                                      | <input type="checkbox"/> VN ベトナム Vietnam  |



第Ⅴ項 表: 出願書類の提出

他の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願: 国名	広域出願: * 広域官庁名	国際出願: 受理官庁名
(1) 19.01.98	平成10年特許願 第20112号	日本国 Japan		
(2) 31.03.98	平成10年特許願 第101797号	日本国 Japan		
(3) 28.09.98	平成10年特許願 第288701号	日本国 Japan		

☒ 上記( )の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る)のうち、次の( )の番号のものについては、出願書類の記録原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁(日本国特許庁の長官)に対して請求している。

(1) (2) (3)

\* 先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(i))。追記欄を参照。

第Ⅶ項 国際出願の追記欄

国際出願の追記欄 (ISA) の追記欄

先の出願が本条第Ⅴ項の第1項第1号に規定する(先の出願が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

出願日 (日、月、年)

出願番号

国名(又は広域官庁)

ISA / J P

第Ⅷ項 出願書類: 出願書類の管理

この国際出願の出願書類の枚数は次のとおりである。

願書 ..... 5 枚  
 明細書(配列表を除く) ..... 66 枚  
 請求の範囲 ..... 3 枚  
 要約書 ..... 1 枚  
 図面 ..... 14 枚  
 明細書の配列表 ..... 0 枚

合計 89 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- ☒ 手数料計算用紙
- ☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
- ☒ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
- ☒ 別個の記名押印された委任状
- ☐ 包括委任状の写し
- ☐ 記名押印(署名)の説明書
- ☐ 優先権書類(上記第Ⅵ項の( )の番号を記載する)
- ☐ 国際出願の翻訳文(翻訳に使用した音読名を記載する)
- ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
- ☐ スクレオチド又はアミノ酸配列表(フレキシブルディスク)
- ☒ その他(書類名を詳細に記載する)

優先権書類送付請求書

要約書とともに提示する図面:

本国際出願の使用言語名: 日本語

第Ⅸ項 出願書類の署名・押印

各人の氏名(若しくは)を記載し、その次に押印する。

安 達 光 雄

風 早 信 昭

安 達 智







PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07C 47/263, 49/707, 45/52, 45/59, 323/22, C07D 473/18, 473/34, A23L 1/30, 2/00, A61K 31/12, 31/52</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/36383</p> <p>(43) 国際公開日 1999年7月22日(22.07.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00109</p> <p>(22) 国際出願日 1999年1月14日(14.01.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/20112 1998年1月19日(19.01.98) JP 特願平10/101797 1998年3月31日(31.03.98) JP 特願平10/288701 1998年9月28日(28.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP] 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者：および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 美 容子(TATSUMI, Yoko) [JP/JP] 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP] 大野木宏(OHNOGI, Hiromu) [JP/JP] 小林英二(KOBAYASHI, Eiji) [JP/JP] 務 華康(WU, Hua-Kang) [CA/JP] 小山信人(KOYAMA, Nobuto) [JP/JP] 猪飼勝重(IKAI, Katsushige) [JP/JP]</p>		<p>加藤郁之進(KATO, Ikunoshin) [JP/JP] 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title: SUBSTANCES CAPABLE OF INDUCING APOPTOSIS

(54) 発明の名称 アポトーシス誘発能を有する物質

(57) Abstract

A process for producing substances capable of inducing apoptosis characterized by involving the step of heating at least one compound selected from among the following compounds (a) to (d), provided that uronic acid and/or uronic acid derivatives and compounds containing uronic acid and/or uronic acid derivatives are excluded therefrom: (a) pentoses; (b) pentose derivatives; (c) compounds containing pentoses; and (d) compounds containing pentose derivatives.

# (57)要約

下記 (a)、(b)、(c)、(d) より選択される少なくとも 1 種の化合物 (但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く) を加熱処理する工程を包含することを特徴とするアボトシス誘発能を有する物質の製造方法。

- (a) ペントース、
- (b) ペントース誘導体、
- (c) ペントースを含有する化合物、
- (d) ペントース誘導体を含有する化合物。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロバキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ギンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CC	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		



## 明細書

アポトーシス誘発能を有する物質

発明の属する技術分野

本発明は、医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発能を有する物質、その製造方法、及び該アポトーシス誘発能を有する物質を含有する医薬、食品又は飲料に関する。

## 従来の技術

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死である。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化されることによりプログラム死タンパク質が生合成され、またある場合には不活性型として細胞内に存在するプログラム死タンパクが活性化される。こうして生成した活性型プログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは有害な細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

## 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発能を物質、及びその製造方法を提供し、更には該アポトーシス誘発用物質を有効成分として含有する医薬、食品又は飲料を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

が落胆者に対して目的を達成するためには徹底的検討と執照（*license*）の取得が重要である。

より得られる加熱処理物が、がん細胞に強いアポトーシス誘発作用を有することを見出し、該加熱処理物中の活性成分であるアポトーシス誘発能を有する物質の単離にも成功し、本発明を完成した。

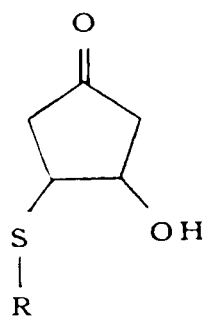
本発明を概説すれば本発明の第1の発明は、下記(a)、(b)、(c)、(d)より選択される少なくとも1種の化合物(但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く)を加熱処理する工程を包含することを特徴とするアポトーシス誘発能を有する物質の製造方法に関する。

- (a) ペントース、
- (b) ペントース誘導体、
- (c) ペントースを含有する化合物、
- (d) ペントース誘導体を含有する化合物。

本発明を限定するものではないが、本発明の第1の発明の態様として、ペントースとしてはリボース又はキシロースが例示される。ペントース誘導体としてはデオキシペントース、例えばデオキシリボース、5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントース誘導体、例えばリン酸基又は硫酸基が結合したペントース誘導体が例示される。またペントースを含有する化合物としてはリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はリボ核酸、及び5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントース、例えばリン酸基又は硫酸基が結合したペントースが例示される。ペントース誘導体を含有する化合物としてはデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド又はデオキシリボ核酸が例示される。またアポトーシス誘発能を有する物質としては4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、1, 5-エポキシー-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オン、及び4, 5-シヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンから選択される化合物が例示される。

本発明の第2の発明は、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、1, 5-エポ

キシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン及び下記一般式〔I〕で表される化合物から選択されるアポトーシス誘発性化合物に関する。



〔I〕

(式中、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

本発明を限定するものではないが、本発明の第2の発明の態様においてSH基含有化合物としてはシステイン、グルタチオンが例示される。

本発明の第3の発明は4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン、1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オン、及び一般式〔I〕で表される化合物から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン、1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オン、及び一般式〔I〕で表される化合物から選択される化合物に関する。

本発明は、4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン、1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オン、及び一般式〔I〕で表される化合物から選択される化合物を有効成分とする疾病治療用医薬又は予防用医薬に関する。

本発明は、4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン、1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オン、及び一般式〔I〕で表される化合物から選択される化合物を有効成分とする疾病治療用医薬又は予防用医薬に関する。

がん剤、アポトーシス誘発剤、抗リウマチ剤、ヒトインスリン様増殖因子産生誘導剤、活性酸素産生抑制剤、又は熱ショックタンパク誘導剤が例示される。

本発明の第4の発明は、下記(a)、(b)、(c)、(d)より選択される少なくとも1種の化合物(但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く)を加熱処理して得られるアポトーシス誘発能を有する加熱処理物及び／又はその部分精製物を含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料に関する。

- (a) ペントース、
- (b) ペントース誘導体、
- (c) ペントースを含有する化合物、
- (d) ペントース誘導体を含有する化合物。

本発明を限定するものではないが、第4の発明の態様において、食品又は飲料としては、制がん用、アポトーシス誘発用、抗リウマチ用、ヒトインスリン様増殖因子産生誘導用、活性酸素産生抑制用又は熱ショックタンパク誘導用食品又は飲料が例示される。

#### 図面の簡単な説明

図1は4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンのマススペクトルを示す図である。

図2は4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

図3は4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オンのマススペクトルを示す図である。

図4は4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

図5は1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンのマススペクトルを示す図である。

図6は1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

図8は2-(トランス-3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサランの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

図9はパントースの濃度と4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン生成量との関係を示す図である。

図10はピーク1のマススペクトルを示す図である。

図11はピーク3のマススペクトルを示す図である。

図12はピーク1の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

図13はピーク3の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

図14は2-(トランス-3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランを添加して各培養条件で培養した時の培地中の $\text{NO}_3^-$ 濃度を示す図である。

## 発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

ペントースは炭素を5個持つ糖の総称であり、アルドペントースとしてはアラビノース、キシロース、リボース、リキソース等が、ケトペントースとしてはリブロース、キシルロース等が天然に存在する。

ペントース誘導体としては、例えばデオキシペントース、ペンチトールが挙げられ、前者ではデオキシリボース、後者ではリビトール、アラビトール、キシリトールが天然に存在する。また、炭素数5のアミノ糖、アルドン酸、アルダル酸は、糖質の代謝物として、あるいは糖質の誘導体として、あるいは糖質の分解産物として得られる。

高分子化合物が挙げられる。また、ペストースのエステル、エーテル、配糖体、

。ペントース誘導体を含有する化合物の例としては、デオキシペントースを含有するデオキシペントースリン酸、デオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸、ペンチトールを含有するリボフラビン、リビトール、テイコ酸が挙げられる。また、ペントース誘導体のエステル、エーテル、アミド、配糖体、これらの塩等もペントース誘導体を含有する化合物であり、合成法等で得られる。

リボ核酸、リボヌクレオチド、リボヌクレオシド、デオキシリボ核酸、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシドは補酵素として働いたり遺伝情報の保存及び発現を担っていたりして生物にとって極めて重要な物質である。リボース-5-リン酸、リブローース-5-リン酸、キシロース-5-リン酸は、ペントースリン酸回路の代謝中間体として広範囲の生物種に見出される。植物のゴム質、粘質物、ヘミセルロースや細菌の多糖はアラビノースやキシロースを含んでおり、ヒト心筋中のリキソフラビンやある種の抗生物質はリキソースの誘導体である。

5 位に負電荷を持ちうる基が結合したペントース及び5 位に負電荷を持ちうる基が結合したペントースを含有する化合物も本発明で使用するペントースを含有する化合物に含まれる。本発明において負電荷を持ちうる基とは、通常の化学反応が行われる条件、すなわち、pH 1～13、0℃～200℃の少なくとも1個の条件において水溶液中で負電荷を持つ基であればよく、リン酸基、硫酸基が例示される。また、本明細書においてはこれらの塩、エステル、酸無水物も負電荷を持ちうる基に含まれる。但し、カルボキシル基は負電荷を持ちうる基であるが、5 位にカルボキシル基を持つアルドペントースはウロン酸であるので本発明で使用するペントースを含有する化合物からは除外される。

本発明で使うことができる、5 位に負電荷を持ちうる基が結合したペントースに特に限定はなく、加熱処理によりアポトーシス誘発能を有する物質、例えば4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンを生成する物はすべて本発明のペントースを含有する化合物に包含される。すなわち、加熱処理により

、例えば 4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンを生成すればそのペントースの種類、負電荷をもちうる基の種類は問わない。5 位に負電荷をもちうる基が結合したペントースの例としてはリボース-5-リン酸、リボース-5-硫酸が挙げられる。

本発明において、5位に負電荷をもちうる基が結合したペントースを含有する化合物とは、特に限定されるものでなく、例えば、リボ核酸、リボヌクレオチド、リボヌクレオント、それらの化学的、酵素的、物理的処理物である、その分解物、分解物の誘導体、分解物の塩を使用することかできる。

本発明において上記のペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含有する化合物の種類は加熱処理によってアポトーシス誘発能を有する物質が生成するものであれば何ら限定はない。また、ペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含有する化合物は動植微生物の細胞から抽出する、発酵法で製造する、化学的に合成する等の方法で得られるが、これらがいかなる方法で製造されていても加熱処理によってアポトーシス誘発能を有する物質が生成する限り本発明で使用可能である。

本発明ではペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物及び／又はペントース誘導体を含有する化合物の含有物も使用できる。様々なペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含有する化合物が動植物の組織、動植微生物の細胞には含有されているので、これらをそのまま本発明で使用することもできる。なお本発明においてはペントース及び／又はペントース誘導体を含有する化合物からはウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物が除かれる。ウロン酸誘導体とはウロン酸のラクトン化、糖のエステル、ウロン酸のアミド、ウロン酸の塩等である。

ないか。上記（a）～（d）から選択される少なくとも1種の化合物（但しウロチン酸は除く）を含有する。

する化合物を除く)を、例えば30～400℃で数秒～数日、好ましくは50～200℃で数秒～24時間加熱処理を行うことにより、アポトーシス誘発能を有する加熱処理物を得ることができる。加熱処理物中には複数のアポトーシス誘発能を有する物質が生成されており、目的に応じて、pH、時間、温度、原料濃度等の加熱処理条件を変えることにより、希望する物質を含有するアポトーシス誘発能を有する加熱処理物を調製することができる。

例えばリボース又はリボース-5-リン酸を使用する場合、例えば80～150℃で数分～数日の加熱処理を行うことにより、4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンを有する加熱処理物を得ることができる。

以下、アポトーシス誘発能を有する、上記(a)～(d)から選択される化合物の加熱処理物を単に本発明の加熱処理物と称す。

加熱処理時の原料の濃度はその加熱処理によりアポトーシス誘発能を有する物質が得られる範囲内であれば特に限定は無く、操作性、収率等の点を考慮し設定すれば良い。本発明における加熱処理は湿式加熱でも、乾式加熱でも良い。湿式加熱としては、水蒸気加熱、水蒸気加圧加熱、加圧式加熱等任意の湿式加熱方法を用いることができる。乾式加熱としては、乾燥熱風による直接加熱法、熱源から隔壁を通して加熱する間接加熱法等が使用できる。直接加熱方法としては、気流乾熱法、噴霧乾熱法等があり、間接加熱法としてはドラム乾熱法等が使用できる。また本発明のアポトーシス誘発能を有する物質の原料は通常の、煮る、焼く、炒る、煎じる、蒸す、炒める、揚げる等の任意の加熱方法で処理することができる。

本発明のアポトーシス誘発能を有する物質はアポトーシス誘発作用を指標に精製処理を行っても良い。精製手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良い。

例えば、リボースを使用し、その2M水溶液を121℃で14時間加熱処理することにより、加熱処理物中に4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンが生成される。この加熱処理物中の4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。次にこの濃縮物をシリカ



ゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出する4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン画分を濃縮し、濃縮物から4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンをクロロホルムで抽出し、抽出濃縮物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、本発明の加熱処理物中の4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンが単離される。

また上記リボース加熱処理物をイオン交換樹脂カラム、好ましくは陰イオン交換樹脂カラム処理し、非吸着性画分を集めることにより4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンが精製される。あるいは上記リボース加熱処理物を活性炭カラム処理し、非吸着画分の除去、カラムの洗浄を行った後、親水性有機溶媒、例えばエクソール水溶液、好ましくは40%以上のエクソール水溶液で溶出することにより、精製4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを得ることができ、これらの方法を組合せることにより、更に高純度の精製4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを得ることができる。

また同様の精製手段を用い、本発明の加熱処理物中より、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、又は1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される化合物を得ることができる。

なお、これらの精製手段により精製された精製物及び部分精製物も本発明のアポトーシス誘発能を有する物質に包含される。

本発明者らは本発明の加熱処理物中に、バイオケミストリー (Biochemistry)、第35巻、第659～665頁(1996)に記載のトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、及びこれらの類縁体が含有されていることを見出し、これらの化合物が細胞死作用、アポトーシス誘発作用等を示すことを見出し、

本発明の加熱処理物中に、バイオケミストリー (Biochemistry)、第35巻、第659～665頁(1996)に記載のトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、及びこれらの類縁体が含有されていることを見出し、

本発明の加熱処理物中に、バイオケミストリー (Biochemistry)、第35巻、第659～665頁(1996)に記載のトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、及びこれらの類縁体が含有されていることを見出し、

シー 3-ペンテン-2-オン、4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを単離することに成功した。また、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールより 2-(トランス-3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキソランが生成することを見出し、単離に成功した。また 4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンと SH 基含有化合物が反応し、一般式〔I〕で表される化合物が生成することを見出し、単離に成功した。更にこれらの化合物ががん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性等の生理活性を有することを見出した。

したがって、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-クアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキソラン、1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オン及び一般式〔I〕で表される化合物(以下、本発明の化合物と称す)から選択される化合物を有効成分とすることにより、本発明の化合物に感受性を示す疾患、例えばがん性疾患、アポトーシス誘発を要する疾患、活性酸素産生抑制を要する疾患、活性酸素産生抑制を要する疾患、ヒトインスリン様増殖因子産生誘導を要する疾患、熱ショックタンパク産生誘導を要する疾患等の治療用医薬又は予防用医薬を提供することができる。

本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればアポトーシス誘発剤を製造することができる。すなわち一般的には、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分と

して含有するアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニト、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を、希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有するアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の加熱処理物を有効成分として含有するアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当たり1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、それ以上は適量を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそ

よう

本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有するアポトーシス

誘発剤は、本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有するアポトーシス

者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物はがん細胞にアポトーシス誘発作用、細胞増殖抑制作用、トポイソメラーゼII阻害作用等を有し、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として制がん剤を製造することができる。すなわち、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。

制がん剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

制がん剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の加熱処理物を有効成分とする制がん剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有する制がん剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

リウマチは骨膜細胞や軟骨細胞に障害が起こる自己免疫疾患である。本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物は、滑膜細胞へのアポトーシス誘発作用を有する。したがって、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として抗リウマチ剤を製造することができる。すなわち、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗リウマチ剤を製造することができる。抗リウマチ剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。

抗リウマチ剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

抗リウマチ剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の加熱処理物を有効成分とする抗リウマチ剤の投与量は、その製剤形態に依存する。本発明の化合物は、本発明の加熱処理物と同等の効果を有する。したがって、本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とする抗リウマチ剤の投与量は、成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。

本発明の化合物は、本発明の加熱処理物と同等の効果を有する。したがって、本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とする抗リウマチ剤の投与量は、成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。

分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有する抗リウマチ剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当たり0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

ヒトインスリン増殖因子（以下、hIGF-1と称す）は種々の細胞に多彩な生理作用を有し、II型糖尿病（インスリン非依存性）と成長障害疾患（小人症）への治療薬として使用されている。本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物はhIGF-1産生誘導作用を有する。従って、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分としてhIGF-1産生誘導剤を製造することができる。すなわち、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればhIGF-1産生誘導剤を製造することができる。hIGF-1産生誘導剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。hIGF-1産生誘導剤はhIGF-1産生誘導を要する疾患、II型糖尿病の治療薬、予防薬、小人症の治療薬等として使用することができる。

hIGF-1産生誘導剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

hIGF-1産生誘導剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注

射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の加熱処理物を有効成分とする h I G F - 1 産生誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人 1 日当り 1 ~ 1 0 0 0 m g、好ましくは 1 0 ~ 2 0 0 m g である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有する h I G F - 1 産生誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人 1 日当り 0 . 0 1 ~ 5 0 m g、好ましくは 0 . 1 ~ 1 0 m g である。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物は活性酸素産生抑制作用を有し、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とする活性酸素産生抑制剤を製造することができ、活性酸素産生抑制を必要とする疾患に応じた方法で投与することかできる。

すなわち本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物は活性酸素の産生抑制に有効であり、該化合物を有効成分とする活性酸素産生抑制剤

を有する。

活性酸素は、大きくラジカルと非ラジカルの活性酸素に分類することかできる

（ラジカル活性酸素：超酸素陰イオン、水素過酸、ヒドロキシルラジカル、

ル、ペルオキシラジカル、アルコキシラジカル、二酸化窒素、一酸化窒素（以下、NOと略す）、チールラジカル、スーパーオキシドがある。一方、非ラジカル系活性酸素には、一重項酸素、過酸化水素、脂質ヒドロペルオキシド、次亜塩素酸、オゾン、ペルオキシ亜硝酸がある。いずれも多くの病態、すなわち、各種の炎症性疾患、糖尿病、がん、動脈硬化、神経疾患、虚血再灌流障害などに関わりがある。

例えばNOは内皮細胞由来血管平滑筋弛緩因子（EDRF）の本体である〔ネーチャー（Nature）、第327巻、第524～526頁（1987）〕。本発明によりNO産生の抑制を必要とする疾病治療剤又は予防剤が提供される。

本発明において、NO産生の抑制を必要とする疾病とは、特に限定はないが、例えば毒性ショックやある種のサイトカインによる治療等による全身性血圧低下、血圧応答低下、自己免疫疾患、炎症、関節炎、リウマチ性関節炎、糖尿病、炎症性腸疾患、血管機能不全、病理性血管拡張、組織損傷、心臓血管系虚血、痛感過敏症、脳虚血、血管新生を伴う疾病、がん等があり、特表平9-504524号、特表平9-505288号、特表平8-501069号、特表平8-512318号、特表平6-508849号の各公報に記載の疾病を含むものである。本発明の活性酸素産生抑制剤は、NO産生抑制剤として、NO産生抑制を要する疾患の治療、予防に有用である。

活性酸素産生抑制剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

活性酸素産生抑制剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の加熱処理物を有効成分とする活性酸素産生抑制剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によ



って適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有する活性酸素産生抑制剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当たり0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物は熱ショックタンパク誘導作用を有し、本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とする熱ショックタンパク誘導剤を製造することができ、熱ショックタンパク誘導を必要とする疾患に応じた方法で投与することができる。

すなわち本発明の加熱処理物、又は本発明の化合物は70kダルトン(HSP70)等の熱ショックタンパク誘導活性を有し、肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヘルペスウイルス等のRNAウイルス、DNAウイルスに対する抗ウイルス作用を有する。また、熱ショックタンパクはがん免疫に関与しており、これらの化合物はがん免疫にも有効である。更に抗炎症等生体防衛作用をも有する。本発明の加熱処理物、又は本発明の

1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* were determined by the method of Lichtenthaler and Sponholz (1980).

なお熱ショックタンパクは細胞や個体が平常の温度よりも5～10℃程度高い

物から高等真核生物まで幅広く分布している。真核生物の熱ショックタンパクとしてはHSP90、HSP70、ユビキチン、HSP26等が知られている。その中でHSP70は分子シャペロン的一种であり、フォールディングが完了していない、または不完全にフォールディングしたタンパクに結合して立体構造の形成を助ける。熱ショックタンパクのアミノ酸配列は進化の過程でよく保存されており、HSP70は大腸菌のDnaKタンパクと相同である。ヒトには約10個のHSP70遺伝子が存在しているが、これらのあるものは構成的に発現しており、あるものは様々な刺激によって誘導される。熱ショックタンパクの合成は熱ショックのほかに様々な化学物質、酸化ストレス等の細胞障害によっても誘導される。

熱ショックタンパク誘導剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

熱ショックタンパク誘導剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の加熱処理物を有効成分とする熱ショックタンパク誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物の量が成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として含有する熱ショックタンパク誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用さ

れる患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、又は本発明の化合物から選択される化合物をアポトーシス誘発用飲食品、制がん用飲食品、抗リウマチ用飲食品、h I G F - 1 産生誘導用飲食品、活性酸素産生抑制用飲食品又は熱ショックタンパク誘導用飲食品の原料として用いても良い。

本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、又は本発明の化合物から選択される化合物を含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料は、食品又は飲料中に本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、又は本発明の化合物から選択される化合物の生理作用を発現するための必要量が含有されておれば良い。

本発明の食品又は飲料、例えばアポトーシス誘発用食品又はアポトーシス誘発用飲料、制がん用食品又は制がん用飲料等のそれぞれの製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料にアポトーシス誘発作用又は制がん作用等を有する本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、又は本発明の化合物から選択される化合物の有効量が含有、希釈及び／又は添加されていれば良い。

なお本発明の加熱処理物の部分精製物は、本発明の加熱処理物を精製して得られるものであり、アポトーシス誘発能を有するものであれば限定はなく、通常の食品、飲料の原料の精製工程で使用される方法で得られるものであれば特に限定

る本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、又は本発明の化合物から選択

される化合物を含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料は、食品又は飲料

限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ソル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の加熱処理物、その部分精製物、本発明の化合物はその生理活性を有する有効量をマウスに投与しても急性毒性は認められず、例えば4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンをそれぞれ100mg/kgでマウスに単回経口投与しても死亡例は認められない。

本発明の薬剤は生体の恒常性の維持に有用である。また本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、又は本発明の化合物から選択される化合物を有効成分として使用するアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等と生体の関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。

食品又は飲料中に本発明の加熱処理物及び／又はその精製物を含有させることにより、アポトーシス誘発用の食品又は飲料、制がん用の食品又は飲料、抗リウマチ用の食品又は飲料、h I G F - 1 産生誘導用の食品又は飲料、活性酸素産生抑制用又は熱ショックタンパク誘導用の食品又は飲料を製造することができる。本発明の加熱処理物及び／又はその精製物を含有する食品又は飲料は、該加熱処理物及び／又はその精製物の有する種々の生理活性、すなわちアポトーシス誘発作用、制がん作用、抗リウマチ作用、h I G F - 1 産生誘導作用、活性酸素産生抑制作用、熱ショックタンパク誘導作用等によって、これらを摂取することにより発がん予防、がん抑制効果、抗ウイルス効果等を有する健康食品又は飲料であり、生体の恒常性の維持、特に胃腸健康維持に有用な食品又は飲料である。

なお4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンは化学合成法で調製しても良い。その公知の合成法としては、タナカ (Tanaka, T.) らの方法〔テトラヘドロン (Tetrahedron)、第32巻、第1713頁 (1976)〕、ナラ (Nara, M.) らの方法〔テトラヘドロン、第36巻、第3161頁 (1980)〕、及びジル (Gill, M.) らの方法〔オーストラリアン ジャーナル オブ ケミストリー (Aust. J. Chem.)、第34巻、第2587頁 (1981)〕が挙げられる。これらの方法は合成段階が多く複雑であり、収率も低く、効率の良い製造方法で

はない。そこで本発明者らは4-シクロペンテン-1, 3-ジオンを塩化セリウム(III)及び水素化ホウ素ナトリウムで還元することによって、1段階で、高収率で4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンが得られることを見出した。すなわち本発明により4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの工業的な合成方法が提供された。

4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンその光学活性体及び/又はそれらの塩と、SH基含有化合物とを反応させることにより、反応液中に前出一般式〔I〕で表される化合物(以下、チオ誘導体と称す)が生成する。

SH基含有化合物は何ら限定はなく、例としてはメタンチオール、ブタンチオール、メルカプトエタノール、SH基含有アミノ酸、SH基含有アミノ酸誘導体等が挙げられる。SH基含有アミノ酸の例としては、システイン、ホモシステイン等が挙げられる。

SH基含有アミノ酸誘導体としては、上記アミノ酸の誘導体、例えばシステイン誘導体、システイン含有ペプチド、システイン誘導体含有ペプチドが例示される。システイン含有ペプチドとしてはペプチド中にシステインが構成成分となっていれば良く、特に限定はない。システイン含有ペプチドとは、オリゴペプチド、例えばグルタチオンのような低分子物からタンパク質のような高分子物までを包含する。またシスチン又はホモシスチンを含有するペプチドも反応中にシステイン又はホモシステイン含有ペプチドとなる条件下、例えば還元処理を組合せることにより、システイン又はホモシステイン含有ペプチドとして使用することができる。なおシステイン含有ペプチドとしては、糖質、脂質等を含有するシステイン含有ペプチドも包含される。また、上記した各種の物の塩、酸無水物、エステル等であってもよい。

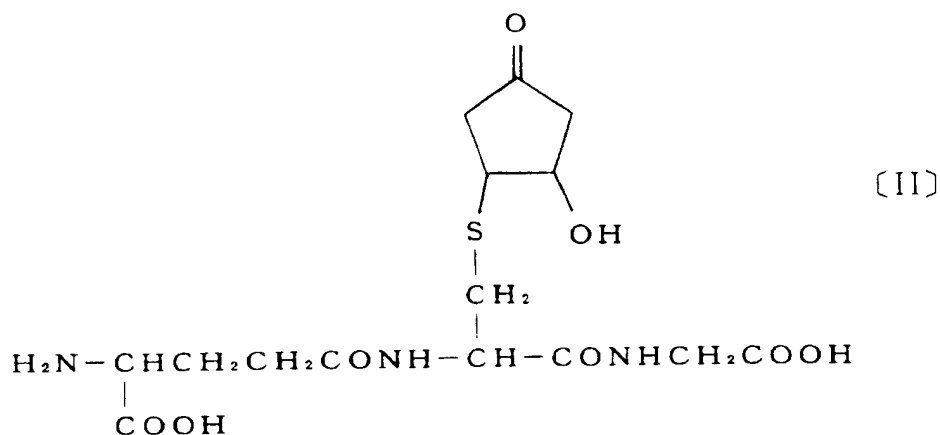
以上、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンはSH基含有化合物と

それらの塩と、SH基含有化合物(例えばSH基含有アミノ酸、又はその誘導体

を反応させることにより、前記一般式〔I〕で表される化合物が生成する。

、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中の本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を精製、単離することができる。

例えば等モルの4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンとグルクチオン（還元型）を反応させることにより、反応液中に下記式〔II〕で表されるチオ誘導体が生成し、この誘導体を含有する反応生成物のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行うことにより、該チオ誘導体を精製、単離することができる。



チオ誘導体の光学活性体の分離はラセミ混合物の機械的分割、優先晶出法、ジアステレオマー塩あるいは包接化合物としての結晶化による分割、酵素・微生物による動力学的分割、クロマトグラフィーによる分割等により行うことができる。

クロマトグラフィーによる分離としては、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を用いることができ、それぞれに適したキラル固定相を使用すればよい。

液体クロマトグラフィーによる光学分割としては、キラルな固定相を用いる方法、キラルな溶離液を用いる方法、ジアステレオマーとしての分離等を用いることができる。

キラル固定相としてはアミド系固定相、尿素系固定相、配位子交換型固定相、

多糖・多糖誘導体固定相、タンパク質固定相、ポリメタクリル酸エステル固定相、ポリメタクリルアミド固定相等が使用できる。

溶離液としてはヘキサン系、アルコール系、水（緩衝液）系等が使用でき、上記固定相との組合せにおいて適宜使用することができる。

チオ誘導体又はその光学活性体の塩としては、医薬として許容される塩があり、公知の方法にて変換することができる。

チオ誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は制がん活性、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性等の生理活性を有し、これらの活性により、チオ誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物を有効成分として含有する医薬を提供することができる。

#### 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における％は重量％を意味する。

##### 実施例 1

1 M L (+) - アラビノース（和光純薬社製、0 1 0 - 0 4 5 8 2）水溶液、1 M D (-) - アラビノース（和光純薬社製、0 1 3 - 0 4 5 7 2）水溶液、1 M D (+) - キシロース（ナカライテスク社製、3 6 7 - 1 9）水溶液、D - リボース（ナカライテスク社販売、3 0 2 - 1 0）水溶液の pH は順に 5.3、4.9、4.4、4.7 であった。

これらを 121℃で 4 時間加熱処理し、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対するアポトーシス誘発活性を次のように測定した。

各々の加熱物及び非加熱物を 0.22  $\mu$ m のメンブレンフィルターで滅菌し、アポトーシス誘発活性の試料を調製した。これらの試料を滅菌蒸留水で 2 倍、4

倍に希釈した。

希釈した試料を 96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$ l ずつ加え、37℃で 4 時間培養した。

タイタープレートのウェルに入れた。そこに5000個のHL-60細胞(ATCC CCL 240)を含む10% ウシ胎児血清(ギブコ社製)含有RPMI 1640培地(ニッスイ社製) 90  $\mu$ lを加え、5% 炭酸ガス存在下37°Cで48時間培養した。光学顕微鏡で細胞の形態を観察した後、5 mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT;シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10  $\mu$ lを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態、細胞内に生じるホルマザン形成を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパノール 100  $\mu$ lを加えてよくかくはんし、590 nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした(MTT法)。

その結果、非加熱のL(+)-アラビノース水溶液、D(-)-アラビノース水溶液、D(+)-キシロース水溶液及びD-リボース水溶液添加区分においては対照の水添加区分と細胞増殖の違いが認められず、アポトーシス誘発活性が認められなかった。一方、121°Cで4時間加熱処理したL(+)-アラビノース水溶液、D(-)-アラビノース水溶液、D(+)-キシロース水溶液、D-リボース水溶液の、各々4倍、4倍、8倍、16倍希釈液添加区分において検鏡によって細胞の変形が見られ、590 nmにおける吸光度が水添加の対照と比べて減少していたことからがん細胞増殖抑制活性が認められた。

## 実施例2

(1) 1M 2-デオキシ-D-リボース(シグマ社製、D2751)水溶液と0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液のpHはそれぞれ4.7、5.4であった。0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液の一部を取り、1N NaOHでpH7.1に調整した。これらを121°Cで4時間加熱処理し、HL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を実施例1の方法で測定した。なお、希釈倍率は2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍及び128倍とした。

その結果、非加熱の2-デオキシ-D-リボース水溶液添加区分においては対照の水添加区分と細胞増殖の違いが認められず、アポトーシス誘発活性が認められなかった。一方、121°Cで4時間加熱処理した1M 2-デオキシ-D-リ



ボース水溶液、0.1 M 2-デオキシ-D-リボース水溶液 (pH未調整)、0.1 M 2-デオキシ-D-リボース水溶液 (pH 7.1) の各々、128倍、16倍、16倍希釈液添加区分において細胞増殖の抑制が認められた。

(2) 実施例2-(1)で得た1 M 2-デオキシ-D-リボース水溶液の121°C、4時間加熱処理物を以下の逆相HPLCで分離した。

試料注入量：40  $\mu$ l

カラム：YMC-Pack ODS-AM (4.6  $\times$  250 mm、ワイエムシイ社製)

移動相A：水

B：80% アセトニトリル水溶液

流速：0.8 ml/分

溶出：移動相A (5分間)  $\rightarrow$  移動相AからBへの直線濃度勾配 (20分間)  $\rightarrow$  移動相B (5分間)

検出：215 nmにおける吸光度

2分ごとに分取した各画分を減圧下濃縮し、実施例1の方法でHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定した。この結果、画分4 (保持時間6分~8分) に強い活性、画分8 (保持時間14分~16分) に弱い活性が認められた。

(3) 実施例2-(2)の逆相HPLCを繰り返して画分4の乾燥物を調製した。本試料の質量分析をDX302 (日本電子社製) を用いて行った。また、本試料を重ジメチルスルホキシドに溶解してJNM-A500 (日本電子社製) を用いて核磁気共鳴スペクトルを測定した。

FAB-MS

m/z 117 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR

$\delta$  3.44 (2H, m, 5-H), 4.27 (1H, m, 4-H), 4.95 (1H, t, 5-OHのH), 5.32 (1H, d,

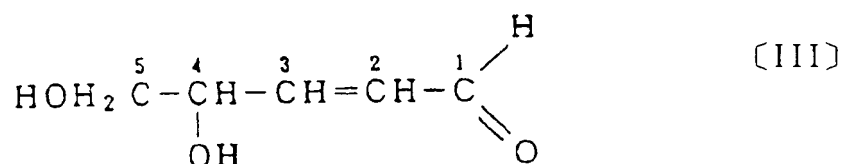
dd, J=4.0, 15.5 Hz, 3-H), 9.55(1H, d, J=8.0 Hz, 1-H)

但し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフトを2.49 ppmとして表わした。

なお<sup>1</sup>H-NMRにおけるシグナルの帰属の番号は下記式〔III〕の通りである。

この結果、本試料の物性値はトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナールと一致し、本試料が下記式〔III〕で表されるトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナールであることが明らかになった。

本試料は強いアポトーシス誘発活性及びがん細胞増殖抑制活性を示した。



### 実施例3

(1) 4種類の100mM デオキシリボヌクレオチド(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)を121℃で4時間加熱した。各加熱試料のがん細胞増殖抑制活性を実施例1に記載のMTT法で測定した。

この結果、dATP、dGTPの各加熱処理物に関しては、16倍希釈液まで、dCTP、dTTPの各加熱処理物に関しては、8倍希釈液まで添加した培地において、水を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、試料添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の水10μl添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

(2) 5種類のデオキシリボヌクレオシド(デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジン、デオキシチミジン、デオキシウリジン)の水溶液を調製し、121℃で4時間加熱した。ただし、それぞれの溶解度が異なるため、水溶液の濃度はそれぞれ、デオキシアデノシン：25mM、デオキシグアノシン：25mM、デオキシシチジン：1M、デオキシチミジン：0.4M、デオキシウリジン：1Mである。

各加熱試料のがん細胞増殖抑制活性を実施例 1 に記載の M T T 法で測定した。この結果、デオキシアデノシン加熱処理液は 2 倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で 1.25 mM）まで、デオキシグアノシン加熱処理液は 4 倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で 0.625 mM）まで、デオキシシチン加熱処理液は 128 倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で 0.78 mM）まで、デオキシチミジン加熱処理液は 16 倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で 2.5 mM）まで、デオキシウリシン加熱処理液は 64 倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で 1.56 mM）まで添加した培地において、水を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、試料添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の水 10  $\mu$ l 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

（3）実施例 3 - （2）で調製したそれぞれの加熱溶液を以下の条件で HPLC で分離した。

カラム：TSK gel ODS-80Ts（5  $\mu$ m）、（20 mm  $\times$  25 cm）  
：東ソー社製）

移動相：A 0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液

B 0.1%TFA / 50%アセトニトリル水溶液

流速：8 ml / 分

溶出条件：10 分間移動相 A 100%  $\rightarrow$  40 分かけて移動相 A 100% から移動相 B 100%  $\rightarrow$  10 分間移動相 B 100%

検出：215 nm における吸光度

実施例 3 - （2）で調製したそれぞれの加熱溶液 1.5 ml を HPLC にかける。1 分毎に分出液を各フラクションを濃縮乾固後水に再溶解して、実施例 1 記

（4）実施例 3 - （3）記載の 1.5 ~ 1.6 分付近のピークの物質を、実施例 2

ールの比較を以下の条件のHPLCで行った。

カラム：TSK gel ODS-80Ts (5 $\mu$ m)、4.6 $\times$ 250mm

移動相：A 0.1% TFA水溶液

B 0.1% TFA/50% アセトニトリル水溶液

流速：1ml/分

溶出条件：10分間移動相A 100% $\rightarrow$ 10分かけて移動相A 100%から移動相B 100% $\rightarrow$ 10分間移動相B 100%

検出：215nmにおける吸光度

その結果、15～16分付近の活性物質の溶出位置はトランス-4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールと一致した。

更に、各加熱物の15～16分付近の活性物質の核磁気共鳴 ( $^1\text{H-NMR}$ ) による構造解析を行った。その結果、15～16分付近の活性物質はトランス-4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールと同定された。

#### 実施例4

(1) 0.25mg/ml デオキシリボ核酸 (DNA) ナトリウム塩 (和光純薬社製、047-22491) 水溶液のpHは8.9であった。この一部を取り、1N HClでpH7.3に調整した。これらを121 $^{\circ}\text{C}$ で4時間加熱処理し、HL-60細胞に対する細胞増殖抑制活性を実施例1の方法で測定した。なお、希釈倍率は2倍、4倍、8倍、16倍及び32倍とした。

その結果、121 $^{\circ}\text{C}$ で4時間加熱処理したDNAナトリウム塩水溶液 (pH未調整)、DNAナトリウム塩水溶液 (pH7.3) の、各々8倍、16倍希釈液添加区分において590nmにおける吸光度が水添加の対照に比べて減少しており、細胞増殖抑制活性が認められた。

(2) 10W/V% DNAナトリウム塩 水溶液を121 $^{\circ}\text{C}$ で2時間加熱処理した加熱処理液を、酢酸エチルと1:2で分配して酢酸エチルに抽出し、減圧留去後、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液に溶解した。

次にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル (富士シリシア化学社製、BW-300SP) 約250 $\text{cm}^3$  をクロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液

で平衡化させてφ25mm×60cmのカラムに充てんし、上記溶解液を、クロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で0.25Kg/cm<sup>2</sup>の圧力でクロマトし、約8mlずつ分画した。

適宜フラクションの溶媒を留去して50%エタノール水溶液に置換後、実施例1記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性を測定した。ただし、試料を50%エタノール水溶液で2倍系列に希釈し、各希釈液2 $\mu$ l又は50%エタノール水溶液2 $\mu$ lを、それぞれ平底96ウェルマイクロプレート<sup>TM</sup>のウェルに入れた。培養時間は16時間とした。

その結果、フラクション65～81、又は177を添加した培養細胞において、50%エタノール水溶液を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、フラクション65～81、又は177添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の50%エタノール水溶液2 $\mu$ l添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

(3) フラクション 65～81 について、薄層クロマトグラフィー及び逆相 HPLC 分析を行い、実施例 1 に記載の MTT 法によりがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス小体形成を測定した結果、がん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発活性が認められた。

薄層クロマトグラフィーは、Silicagel 60F<sub>4</sub>（メルク社製 1.05554）を用い、クロロホルムとメタノールの比が9：1の混合液で展開し、オルシノール硫酸呈色試液で検出した。

逆相HPLC分析は、TSK gel ODS-80Tsカラム(4.6×250 mm、東ソー社製)を用い、流速0.8 ml/分、水で5分間溶出後80%アセトニトリに溶出液を2.0分間の濃度勾配で溶出させ、206 nmにおける吸光度を測定した。

f 値 0.42 のスポットの物質に、逆相 HPLC 分析では保持時間 8.8 分のピ

R<sub>f</sub>値0.42のスポットの物質が検出されたフラクションを集め、溶媒を減圧留去した。

更に、逆相HPLCで活性成分を分取精製した。カラムはTSK gel ODS-80Ts (φ20×250mm、東ソー社製)を用い、水6.5ml/分で溶出させ、206nmにおける吸光度で検出した。ピーク毎に分取し、減圧濃縮後、上記のMTT法により活性を測定し、活性が認められたピークを重水と重ジメチルスルホキシドに溶解し、核磁気共鳴スペクトルにより分析した。

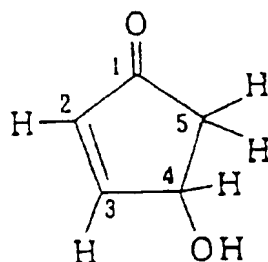
その結果を以下に示す。

#### <sup>1</sup>H-NMR

δ 2.38 (1H, dd, J=2.0, 19.0 Hz, 5-H), 2.98 (1H, dd, J=6.5, 19.0 Hz, 5-H), 5.18 (1H, m, 4-H), 6.47 (1H, dd, J=1.5, 6.0 Hz, 2-H), 7.94 (1H, dd, J=2.5, 6.0 Hz, 3-H),

但し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして示した。

なお、<sup>1</sup>H-NMRにおけるシグナルの帰属の番号は下記式〔IV〕の通りである。



〔IV〕

以上より、本物質は4-ヒドロキシー2-シクロペンテン-1-オンであることが明らかになった。

(4) フラクション177について、実施例4-(3)と同様に、薄層クロマトグラフィー及び逆相HPLC分析を行い、実施例4-(2)に記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス小体形成を測定した結果、がん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発活性が認められた。

上記のフラクション 177 の活性物質は、薄層クロマトグラフィーでは R f 値 0.37 のスポットの物質に、逆相 HPLC 分析では保持時間 16.8 分のピークの物質に対応していた。

R f 値 0.37 のスポットの物質が検出されたフラクション 177 を集め、溶媒を減圧留去した。

更に、逆相 HPLC で活性成分を分取精製した。カラムは TSK gel ODS-80Ts ( $\phi 20 \times 250$  mm、東ソー社製) を用い、水 6.5 ml/分 で溶出させ、206 nm における吸光度で検出した。ピーク毎に分取し、減圧濃縮後、上記の MTT 法により活性を測定し、活性が認められたピークの質量分析を DX302 質量分析計 (日本電子社製) を用いて行った。m-ニトロベンジルアルコールをマトリックスとして用い、ポジティブイオンモードで測定した。

#### FAB-MS

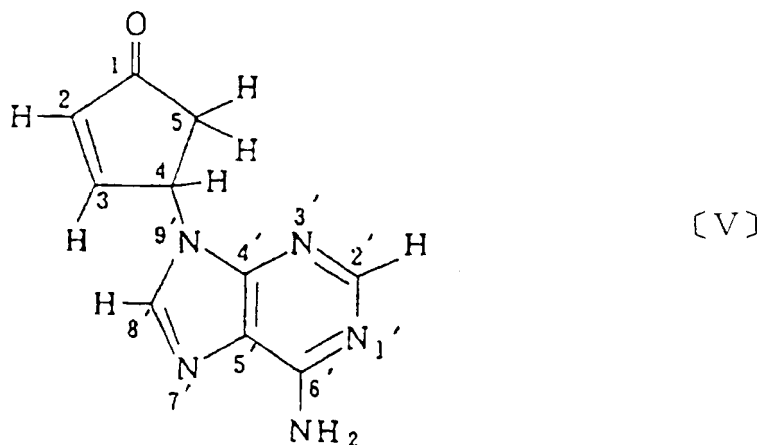
m/z 216 [M+H]<sup>+</sup>

更に、核磁気共鳴スペクトルを測定した。核磁気共鳴装置は JNM-A500 (日本電子社製) を用いた。その結果を以下に示す。

#### <sup>1</sup>H-NMR

$\delta$  2.71 (1H, dd, J=3.0, 18.5 Hz, 5-H), 2.98 (1H, dd, J=7.5, 18.5 Hz, 5-H), 5.89 (1H, m, 4-H), 6.50 (1H, dd, J=2.0, 5.5 Hz, 2-H), 7.24 (2H, br-s, 6'-NH<sub>2</sub> の H), 7.85 (1H, dd, J=2.5, 5.5 Hz, 3-H), 8.10 (1H, s, 2'-H), 8.14 (1H, s, 8'-H)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を 2.49 ppm として表した。



以上より、本物質は4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンであることが明らかになった。

図1に4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンのマススペクトルを示す。図中、横軸は $m/z$ 、縦軸は相対強度(%)を表す。

図2に4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

(5) 10W/V% DNAナトリウム塩水溶液を121°Cで2時間加熱処理した。この加熱処理液を酢酸エチルと1:2で分配し、得られた水相をクロロホルムとメタノールの比が3:1の混合液と1:1で再び分配し、有機溶媒相を減圧留去後、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液を加え、残渣を除去して溶解液を得た。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル(富士シリシア化学社製、BW-300SP)約250cm<sup>3</sup>を上記混合液で平衡化させてφ25mm×60cmのカラムに充てんし、上記溶解液を、0.25Kg<sub>f</sub>/cm<sup>2</sup>の圧力下、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で、次いで6:1の混合液でクロマトグラフィーで展開し、約8mlずつ分画した。

各フラクションを、クロロホルムとメタノールの比が4:1の混合液で薄層クロマトグラフィーで展開し、オルシノール硫酸呈色試液で検出した。フラクショ



ン380から500にかけて、赤褐色に呈色するRf値0.36のスポットが検出された。

フラクション400～420を集め、有機溶媒を減圧留去後エタノールに置換し、逆相HPLCを行った。

HPLCは、TSK gel ODS-80Tsカラム( $\phi 20 \times 250$  mm、東ソー社製)を用い、流速6 ml/分で8%アセトニトリル水溶液で5分間溶出後40%アセトニトリル水溶液へ30分間の濃度勾配法で溶出させ、206 nmにおける吸光度で検出し、溶出時間35分のピークを分取した。

溶出時間35分のピークを、逆相HPLC分析及びHL-60細胞によるMTTアッセイに供した。

逆相HPLC分析は、YMC-Pack ODS-AMカラム( $\phi 4.6 \times 250$  mm、YMC社製)を用い、流速0.8 ml/分で4%から24%アセトニトリル水溶液へ20分間の濃度勾配法で溶出させ、210 nmにおける吸光度で検出したところ、溶出時間14分にシングルピークが検出された。

また、MTTアッセイでは、溶出時間35分のピークの乾燥物の約 $13 \mu\text{g}/\text{ml}$ でも細胞に変形及びアポトーシス小体形成が認められ、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性が認められた。

溶出時間35分のピークを質量分析及び重ジメチルスルホキシドに溶解した核磁気共鳴スペクトルにより分析した。

質量分析はDX302質量分析計を用いた。グリセロールをマトリックスとし、ポジティブイオンモードで測定した。

#### FAB-MS

$m/z$  232  $[\text{M}+\text{H}]^+$

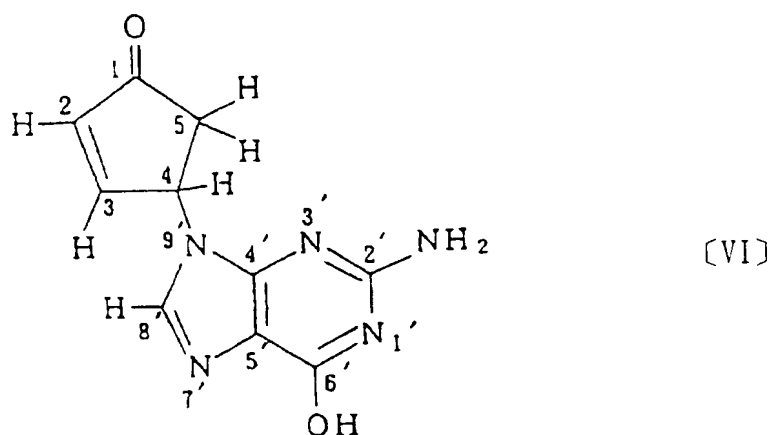
核磁気共鳴装置はJNM-A500を用いた。試料は重ジメチルスルホキシド

#### <sup>1</sup>H-NMR

<sup>1</sup>H-NMR

1 H, dd,  $J = 7.0, 18.5 \text{ Hz}$ , 5-H), 5.65 (1 H, m, 4-H), 6.42 (2 H, br-s, 2'-NH<sub>2</sub>のH), 6.46 (1 H, dd,  $J = 2.0, 6.0 \text{ Hz}$ , 2-H), 7.65 (1 H, s, 8'-H), 7.81 (1 H, dd,  $J = 2.5, 6.0 \text{ Hz}$ , 3-H)

このシグナルの帰属は下記式〔VI〕の番号の通りである。



以上より、本物質は4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オンであることが明らかになった。

図3に4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オンのマススペクトルを示す。図中、横軸は $m/z$ 、縦軸は相対強度(%)を表す。

図4に4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

#### 実施例5

(1) 2M D-リボース(ナカライテスク社製、302-10)水溶液を121℃で4時間加熱処理した。この加熱処理液を減圧濃縮後酢酸エチルと1:2で分配して酢酸エチルに抽出し、酢酸エチルを減圧留去後、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液に溶解した。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル(富士シリシア化学社製、BW-300SP)約250cm<sup>3</sup>をクロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で平衡化させてφ25mm×60cmのカラムに充填し、上記溶解液を、クロロホルム

ムとメタノールの比が9 : 1の混合液で0.2 Kgf/cm<sup>2</sup>の圧力下クロマトグラフィーで展開し、約8 mlずつ分画した。適宜フラクションの溶媒を留去して50%エタノール水溶液に置換後、実施例4-(2)記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性を測定した。

その結果、フラクション28~36を添加した培養細胞において、50%エタノール水溶液を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、フラクション28~36添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の50%エタノール水溶液2  $\mu$ l添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

(2) フラクション28~36について、実施例4-(3)と同様に、薄層クロマトグラフィー及び逆相HPLC分析を行い、実施例4-(2)に記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス小体形成を測定した結果、がん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発活性が認められた。

上記のフラクション28~36の活性物質は、薄層クロマトグラフィーではRf値0.44のスポットの物質に、逆相HPLC分析では保持時間9.7分のピークの物質に対応していた。

Rf値0.44のスポットが主に検出されたフラクション28~36を集め、減圧濃縮し、逆相HPLCで分析したところ、保持時間9.7分のシングル・ピークが検出された。

この画分の質量分析をDX302質量分析計を用いて行った。チオグリセロールをマトリックスとして用い、ポジティブイオンモードで測定した。

#### FAB-MS

m/z 115 [M+H]<sup>+</sup>

97 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>

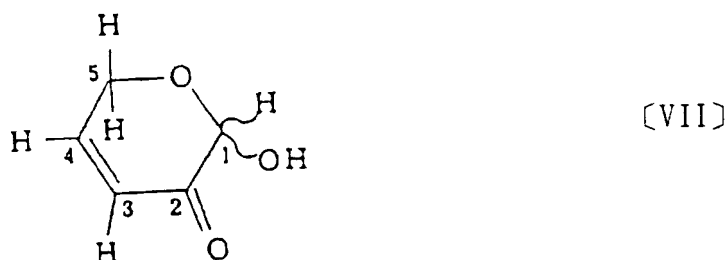
を用いた。その結果を以下に示す。

#### 1H-NMR

$\delta$  4.27 (1H, ddd,  $J=2.0, 4.0, 19.5$  Hz, 5-H),  
 4.51 (1H, td,  $J=2.5, 19.5$  Hz, 5-H), 4.93 (1H,  
 d,  $J=6.0$  Hz, 1-H), 6.02 (1H, m, 3-H), 7.23 (1H,  
 ddd,  $J=2.5, 4.0, 10.0$  Hz, 4-H), 7.26 (1H,  
 d,  $J=6.0$  Hz, 1-OHのH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。

$^1\text{H-NMR}$ におけるシグナルの帰属の番号は下記式〔VII〕の通りである。



以上より、本物質は1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンである事が明らかになった。

図5に1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンのマススペクトルを示す。図中、横軸は $m/z$ 、縦軸は相対強度(%)を表す。

図6に1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

#### 実施例6

(1) 2M 2-デオキシ-D-リボース(シグマ社製、D2851)水溶液を121℃で4時間加熱処理した。この加熱処理液5mlを減圧乾固後、クロロホルムとメタノールの比が98:2の混合液に溶解した。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル(富士シリシア化学社製、BW-300SP)約250cm<sup>3</sup>を上記混合液で平衡化させてφ25mm×60cmのカラムに充てんし、上記溶解液を、クロロホルムとメタノールの比が98:2の混

合液で0.2 Kg f / c m<sup>2</sup> の圧力下クロマトし、約8 ml ずつ分画した。

各フラクションの溶媒を留去して50%エタノール水溶液に置換後、薄層クロマトグラフィー、逆相HPLC分析及びヒト前骨髄性白血病細胞HL-60細胞によるMTTアッセイに供した。

薄層クロマトグラフィーは、Silicagel 60F<sub>54</sub> (メルク社製 1.05554) を用い、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で展開し、オルシノール硫酸呈色試液で検出した。逆相HPLC分析は、TSK gel ODS-80Tsカラム(4.6×250mm、東ソー社製)を用い、流速0.8 ml / 分、水で5分間溶出後80%アセトニトリル水溶液へ20分間の濃度勾配法で溶出させ、206 nmにおける吸光度で検出した。

MTTアッセイは実施例4-(2)に記載の方法で行った。

MTTアッセイにより、フラクション48及び88に強い細胞増殖阻害活性が認められた。フラクション48は、薄層クロマトグラフィーではR<sub>f</sub>値0.52のスポットが、逆相HPLC分析では保持時間9.1分のピークが検出された。フラクション88は、薄層クロマトグラフィーではR<sub>f</sub>値0.35のスポットが、逆相HPLC分析では保持時間9.1分のピークが検出された。

これらのフラクションを質量分析及び重シメチルスルホキシドに溶解した核磁気共鳴スペクトルにより分析したところ、フラクション48は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、フラクション88はトランス-4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールであった。

(2) 実施例6-(1)で調製した、トランス-4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールのエタノール溶液を、-40℃低温フリーザーで静置保存したところ、白色の固形物が生じた。

この固形物をろ紙でろ過し、冷エタノールで洗浄し、エタノール溶液と固形物

ラムクロマトグラフィー用シリカゲル(富士シリシア化学社製、BW-300S

、 $0.2 \text{ Kg f / cm}^2$  の圧力下、同混合液でクロマトし、約  $8 \text{ ml}$  ずつ分画した。

フラクション 90 から 126 にトランス-4、5-ジヒドロキシー-2-ベンテナールが溶出し、フラクション 67 から 76 にサブ物質が溶出した。

上記の固形物及びサブ物質を逆相 HPLC 分析及び HL-60 細胞による MTT アッセイに供した。

逆相 HPLC 分析は、YMC-Pack ODS-AM カラム ( $\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、YMC 社製) を用い、流速  $0.8 \text{ ml / 分}$  で水で 5 分間溶出後 80% アセトニトリル水溶液へ 20 分間の濃度勾配法で溶出させ、 $210 \text{ nm}$  における吸光度で検出した。

固形物では溶出時間 18 分にシングルピークが、サブ物質では溶出時間 18 分にメインピークが検出された。

また、MTT アッセイでは、固形物、サブ物質ともに細胞に変形及びアポトーシス小体形成が認められ、細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘導活性がそれぞれ認められた。

固形物を質量分析及び重ジメチルスルホキシドに溶解した核磁気共鳴スペクトルにより分析した。

質量分析は DX302 質量分析計を用いた。グリセロールをマトリックスとし、ポジティブイオンモードで測定した。

#### FAB-MS

$$\begin{aligned} m/z & \quad 215 \text{ [M+H]}^+ \\ & \quad 237 \text{ [M+Na]}^+ \end{aligned}$$

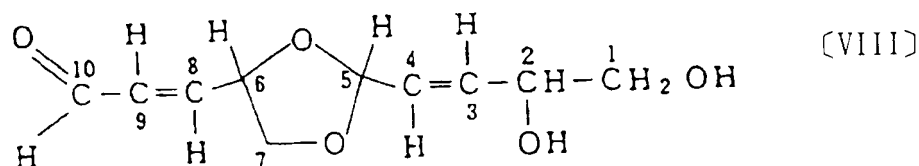
核磁気共鳴装置は JNM-A500 を用いた。試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を  $2.49 \text{ ppm}$  として表記した。

#### $^1\text{H-NMR}$

$\sigma$  3.30 (2H, m, 1-H), 3.80 (1H, dd,  $J=5.0, 8.5 \text{ Hz}$ , 7-H), 4.01 (1H, m, 2-H), 4.05 (1H, t,  $J=$

8.5 Hz, 7-H), 4.66 (1H, t,  $J=6.0$  Hz, 1-OHのH), 4.84 (1H, m, 6-H), 4.96 (1H, d,  $J=5.0$  Hz, 2-OHのH), 5.31 (1H, d,  $J=6.5$  Hz, 5-H), 5.66 (1H, ddd,  $J=1.5, 6.5, 15.5$  Hz, 4-H), 6.01 (1H, d,  $J=4.5, 15.5$  Hz, 3-H), 6.21 (1H, ddd,  $J=1.5, 8.0, 15.5$  Hz, 9-H), 7.03 (1H, dd,  $J=5.5, 15.5$  Hz, 8-H), 9.57 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, 10-H)

このシグナルの帰属は下記式〔VIII〕の番号の通りである。



以上より、本物質は2-(トランス-3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソランであることが明らかになった。

図7に2-(トランス-3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソランのマススペクトルを示す。図中、横軸は $m/z$ 、縦軸は相対強度(%)を表す。

図8は2-(トランス-3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソランの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

(3) 実施例6-(1)記載の加熱処理物の濃縮物を調製し、この濃縮物のシリカクロマトを行った。すなわちカラムクロマトグラフィー用シリカゲル(富士シリシア化学社製 RW-300SP)約250 $\text{cm}^3$ をクロロホルム：メタノール

1:1の溶媒で展開し、溶出液を蒸発させた。

フラクション67~76を分取、濃縮した後、YMC-Pack ODS-A

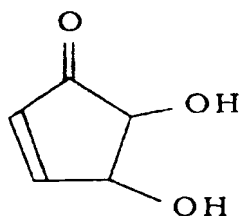
カラムに逆相クロマトグラフィーを行い、溶出液を蒸発させた。

水で5分間溶出後80%アセトニトリル水溶液へ20分間の濃度勾配法で溶出させ、210nmにおける吸光度で検出し、溶出時間18分のシングルピークを分取し、2-(3,4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソランを得た。

#### 実施例7

(1) 10gのD-グルクロン酸(シグマ社製 G 5269)を1リットルの水に溶解し、121℃で4時間加熱した後約10mlになるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2混合液の上層40mlを加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約10mlまで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲルBW-300SP(2×28cm、富士シリシア化学社製)にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.2kg/cm<sup>2</sup>に加圧し、毎分5mlの流速で分離を行った。1画分当り10mlになるようにフラクショネーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度の4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後40mlのクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって100mgの下記式〔IX〕で表される4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンを得た。



〔IX〕

(2) 実施例7-(1)で得られた4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの物性を下記に示す。なお4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの質量分析はDX302質量分析計(日本電子社製)を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いたNMRスペクトルの測定はJNM-A5



00（日本電子社製）を用いた。比旋光度はDIP-370型旋光計（日本分光社製）、UV吸収スペクトルはUV-2500分光光度計（島津製作所社製）、赤外吸収スペクトル（IR）はFTIR-8000赤外分光光度計（島津製作所社製）をそれぞれ用い測定した。

FAB-MS  $m/z$  115  $[M+H]^+$

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  4.20 (1H, d,  $J=2.4\text{ Hz}$ , 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd,  $J=1.2, 6.1\text{ Hz}$ , 2-H)、7.48 (1H, dd,  $J=2.1, 6.1\text{ Hz}$ , 3-H)

但し、 $^1\text{H-NMR}$ の化学シフト値は $\text{CHCl}_3$ の化学シフト値を7.26 ppmとして表した。

旋光度： $[\alpha]_D^{20}$   $0^\circ$  ( $c$  1.3、水)

IR (KBr法)：3400、1715、1630、1115、1060、1025  $\text{cm}^{-1}$ に吸収を有する。

UV： $\lambda_{\text{max}}$  215 nm (水)

この画分をパルパックタイプSカラムを用いた順相HPLCで分離し、215 nmの紫外線吸収で検出したところ、純度は98%であった。

(3) 2M D-リボース（ナカライテスク社販売、302-10）水溶液又は2M D-(+)-キシロース（ナカライテスク社製、367-19）水溶液を各々121°Cで14時間加熱した。これらの加熱処理液90  $\mu\text{l}$ に1Mチオフェノール（ナカライテスク社製、338-01）エタノール溶液10  $\mu\text{l}$ を加えて37°Cで30分間反応させた。こうして得られた加熱処理液及び加熱処理液のチオフェノール反応物を以下の逆相HPLCで分析した。

移動相A：0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液

移動相B：0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）エタノール溶液

流速：0.8 ml/分

溶出：移動相 A（5 分間）→移動相 A から移動相 B への直線濃度勾配（20 分間）→移動相 B（5 分間）

検出：215 nm における吸光度

試料注入量：10  $\mu$ l

加熱処理液を分析した結果、リボースとキシロースのいずれにおいても保持時間 6.5 分のピークが見られた。これは実施例 7-(1) で得た 4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの保持時間と一致する。

加熱処理液のチオフェノール反応物を分析した結果、リボースとキシロースのいずれにおいても保持時間 6.5 分のピークが消滅し、新たに保持時間 19.6 分のピークが出現した。新たに出現したピークは、実施例 7-(1) で得た 4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンをチオフェノールと反応させたときに生ずるピークと一致する。

以上より、リボース又はキシロースを加熱することにより 4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンが生成することが明らかになった。

(4) 0.1 M、0.2 M、0.5 M、1 M 又は 2 M の、D-リボース又は D-(+)-キシロース水溶液を各々 121°C で 14 時間加熱した。実施例 7-(2) と同様の逆相 HPLC で分析し、保持時間 6.5 分のピークの高さを測定し、4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン生成量を測定した。その結果を図 9 に示す。すなわち図 9 はペントースの濃度と 4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン生成量との関係を示す図であり、横軸はペントース濃度 (M) を、縦軸は 4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン生成量 (mM) を示す。なお、図 9 において黒丸印は D-リボース加熱処理物中の 4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン生成量を、黒三角印は D-(+)-キシロース加熱処理物中の 4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン生成量を示す。

#### 実施例 8

(1) 50 mg のリボース-5-リン酸ナトリウム（ナカライテスク社製、3

0.2-1.2)を5mlの水に溶解し、HClでpH3に調整した後、121℃で4時間加熱した。上記加熱物を以下の逆相HPLCで分析した。

カラム：TSK gel ODS-80Ts (4.6mm×250mm、東ソー社製)

移動相：TFA水溶液

流速：1ml/分

検出：215nmにおける吸光度

試料注入量：20μl

その結果、保持時間4.7分のピークが見られ、実施例7-(1)で得た精製4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの保持時間と一致した。また、該精製4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを用いて得られた4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンとピーク面積の関係を示す検量線から、本加熱物中の4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン濃度は6.3μg/mlと算出された。

上記と同様に本加熱物200μlのHPLCを行い、保持時間3.8~5.8分の画分を分取した。同様の操作を2回行い、分取した画分を減圧下濃縮、乾固した。これにN,O-ビス(トリメチルシリル)-アセトアミド(ナカライテスク社製)：トリメチルクロロシラン(ジーエルサイエンス社製)：ピリジン(ピアス社製)=4:1:1の混合液を加えてトリメチルシリル化し、DX-302質量分析計(日本電子社製)を用いてガスクロマトグラフィー/質量分析法で構造を解析した結果、実施例7-(1)で得た精製4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンと同じ保持時間に現れるピークの質量スペクトルは該精製4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンのそれと一致した。

よって4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの生成が確認さ

N-HClでpH2.5に調整した。本試料に含まれる4,5-ジヒドロキシ-

カラム：TSK-gel G2500PW (XL) (7.8×300mm、東ソー社製)

カラム温度：40℃

移動相：水

流速：1ml/分

検出：215nmにおける吸光度

その結果、保持時間11.4分のピークが見られ、実施例7-(1)で得た精製4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの保持時間と一致した。また、該精製4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを用いて得られた4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンとピーク面積の関係を示す検量線から、本加熱物中の4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン濃度は8.9 $\mu$ g/mlと算出された。

以上より、リボース-5-リン酸ナトリウムを加熱することにより、4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンが生成することが明らかになった。

#### 実施例9

2M D-リボース水溶液を121℃で4時間加熱処理した。この加熱処理液を減圧濃縮後酢酸エチルと1:2で分配して酢酸エチルに抽出し、酢酸エチルを減圧留去後、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液に溶解した。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル(富士シリシア化学社製、BW-300SP)約250cm<sup>3</sup>を上記混合液で平衡化させて $\phi$ 25mm×60cmのカラムに充填し、上記溶解液を、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で0.2Kgf/cm<sup>2</sup>の圧力下クロマトし、約8mlずつ分画した。適宜フラクションの溶媒を留去して薄層クロマトグラフィーに供し、Rf値0.5のスポットを有するフラクション38から57を集め、溶媒を留去後50%エタノール水溶液に置換した。薄層クロマトグラフィーは、Silicagel 60F<sub>254</sub>を用い、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で展開し、オルシノール硫酸呈色試液で検出した。

次に、活性物質の逆相HPLCでの分取精製を行った。分取は、TSK gel ODS-80Tsカラム（4.6×250mm）を用い、流速6.5ml/分、水で10分間溶出後60%アセトニトリル水溶液へ15分間の濃度勾配法で溶出させ、206nmにおける吸光度で検出した。溶出時間15分のピークを分取した。

溶出時間 15 分のピークを実施例 4 - (2) 記載の MTT 法によりがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発活性を測定したところ、細胞の変形及びホルマザンの形成阻害が認められ、細胞増殖阻害活性及びアポトーシス誘発活性が認められた。

溶出時間 15 分のピークを、逆相 HPLC 分析した。分析は、TSK gel ODS-80Ts カラム (4.6 × 250 mm) を用い、流速 0.8 ml/分、水で 5 分間溶出後 80% アセトニトリル水溶液へ 20 分間の濃度勾配法で溶出させ、206 nm における吸光度で検出した。この分析において、溶出時間 15 分のピークは溶出時間 5.7 分に溶出され、実施例 7-(1) 記載の 4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンと溶出時間が一致した。また溶出時間 15 分のピークの画分を重シメチルスルホキシドに溶解した核磁気共鳴スペクトルにより分析し、4,5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンのスペクトルを確認した。

### 实施例 10

4-シクロペンテン-1, 3-ジオン (アルドリッチ社: コード16, 168-3) 1 g (10.4 mmol) 及び塩化セリウム(III)・7H<sub>2</sub>O (ナカライテスク社: コード077-20) 1.94 g (5.2 mmol) を水25 ml に溶解した。氷中で攪拌しながらNaBH<sub>4</sub> (ナカライテスク社: コード312-29) 198 mg (5.2 mmol) 徐々に添加し、添加終了後1N HClでpHを

ニール硫酸で検出すると、R<sub>F</sub>値0.15付近に赤色のスポットが検出された。この

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

OH = 40 : 1 100 ml で抽出し、抽出液をシリカゲルでろ過した。このろ液を減圧濃縮後、80 g の中圧シリカクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 40 : 1) で精製し、淡黄色のオイル状の高純度 4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの 236 mg (収率 23%) を調製し、核磁気共鳴スペクトルにより確認した。

#### 実施例 11

50 mM 4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び 100 mM L-グルタチオンを含有する 200 mM リン酸緩衝液 (pH 7) 2 ml を 37°C で 1 時間加温して試料とし、逆相 HPLC クロマトグラフィーにてピークを分取した。カラムは TSK gel ODS-80Ts (φ20 × 250 mm、東ソー社製) を用い、蒸留水 6.5 ml/分で溶出させ、206 nm における吸光度で検出した。ピークを分取後、減圧濃縮し、実施例 1 に記載のヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 細胞による MTT アッセイに供した。

MTT アッセイにより、溶出時間 14.4 分のピーク 1 及び溶出時間 16.6 のピーク 3 にがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス小体の形成が認められた。活性が認められた 2 つのピークを同カラムで再クロマトして精製した。

活性が認められた 2 つのピークを質量分析及び核磁気共鳴スペクトルにより分析した。

質量分析は DX302 質量分析計 (日本電子社) を用い、グリセロールをマトリックスにしてポジティブイオンモードで測定した。

ピーク 1 の FAB-MS ;  $m/z$  406 [M+H]<sup>+</sup>

ピーク 3 の FAB-MS ;  $m/z$  406 [M+H]<sup>+</sup>  
428 [M+Na]<sup>+</sup>

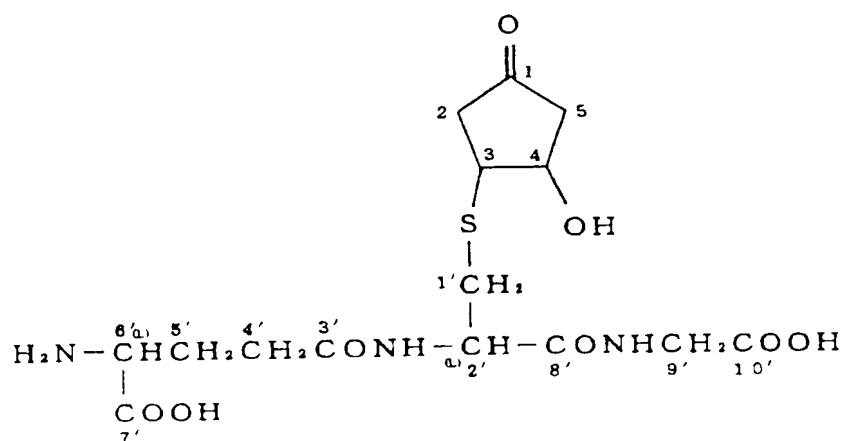
核磁気共鳴装置は JNM-A500 (日本電子社) を用い、重水に溶解して測定した。HOD の化学シフト値を 4.65 ppm とした <sup>1</sup>H-NMR における化学シフト値は以下のとおりであった。

ピーク 1 ;  $\sigma$  2.13 (2H, m, 5'-H)、2.29 (1H, m, 2-H)、2.45 (1H, m, 5-H)、2.50 (2H, m, 4'-H)、2.

6.5 (1H, m, 5-H)、2.69 (1H, m, 2-H)、2.90~3.00 (1H, m, 1'-H)、3.10~3.18 (1H, m, 1'-H)、3.61 (1H, m, 3-H)、3.76 (1H, m, 6'-H)、3.89 (2H, s, 9'-H)、4.50~4.62 (2H, m, 4-H, 2'-H)

ピーク3;  $\sigma$  2.10 (2H, m, 5'-H)、2.27 (1H, m, 2-H)、2.29 (1H, m, 5-H)、2.48 (2H, m, 4'-H)、2.76~2.84 (1H, m, 5-H)、2.84~2.92 (1H, m, 2-H)、2.93~3.02 (1H, m, 1'-H)、3.09~3.21 (1H, m, 1'-H)、3.40 (1H, m, 3-H)、3.73 (1H, m, 6'-H)、3.86 (2H, s, 9'-H)、4.31~4.40 (1H, m, 4-H)、4.59 (1H, m, 2'-H)

ピーク 1 及びピーク 3 のシグナルの帰属は下記式〔X〕のとおりである。



ピーク 1 は 3 R、4 S 体と 3 S、4 R 体のジアステレオマーの混合物であり、ピーク 3 は 3 R、4 R 体と 3 S、4 S 体のジアステレオマーの混合物であった。

以上より、本試料ピーク 1 は 3 位と 4 位がシスのシス-3-L-クルタチオン

トロキシ-2-シクロペンチン-1-オンであることが明らかにされた。

1. 1990年12月15日，在《人民日报》发表署名文章《中国要警惕“新左派”的泛滥》，指出“新左派”泛滥的根源是“对社会主义的误解”。

強度 (%) を表す。

図 1 1 にピーク 3 のマススペクトルを示す。図中、横軸は  $m/z$ 、縦軸は相対強度 (%) を表す。

図 1 2 にピーク 1 の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

図 1 3 にピーク 3 の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

#### 実施例 1 2

(1)  $56^\circ\text{C}$ 、30 分間処理した牛胎児血清 (JRH 社製) を 10% 含む RPMI 1640 培地 (バイオウイタッカー社製) にて  $37^\circ\text{C}$  で培養した HL-60 (ATCC CCL-240) を RPMI 1640 培地にて  $2.5 \times 10^5$  コ / 5 ml となるように懸濁した。

この懸濁液 5 ml に対し、実施例 6-(1) で調製した 4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナールの 12.5 mM、25 mM、50 mM、若しくは 100 mM 70% エタノール水溶液、実施例 6-(1) で調製した 4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの 0.05 mM、0.5 mM、5 mM、若しくは 50 mM 70% エタノール水溶液、実施例 4-(4) で調製した 4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンの 5 mM、10 mM、若しくは 20 mM 70% エタノール水溶液、実施例 4-(5) で調製した 4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オンの 2.5 mM、5 mM、15 mM、若しくは 25 mM 70% エタノール水溶液、実施例 5-(2) で調製した 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オンの 75 mM、150 mM、若しくは 300 mM 70% エタノール水溶液、又は実施例 6-(2) で調製した 2-(トランス-3, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサランの 5 mM、25 mM、若しくは 50 mM 70% エタノール水溶液を 10  $\mu\text{l}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% 二酸化炭素存在下で、24 時間培養した。

培養細胞を光学顕微鏡下で観察し、最終濃度 1  $\mu\text{M}$  以上の 4, 5-ジヒドロキ



シー２－ペンテナール、最終濃度  $10 \mu\text{M}$  以上の４－ヒドロキシ－２－シクロペンテン－１－オン、最終濃度  $10 \mu\text{M}$  以上の４－（９－アデニル）－２－シクロペンテン－１－オン、最終濃度  $39 \mu\text{M}$  以上の４－（９－グアニル）－２－シクロペンテン－１－オン、最終濃度  $625 \mu\text{M}$  以上の１，５－エポキシ－１－ヒドロキシ－３－ペンテン－２－オン、又は最終濃度  $80 \mu\text{M}$  以上の２－（トランス－３，４－ジヒドロキシ－１－ブテニル）－４－（トランス－２－ホルミルビニル）－１，３－ジオキサランの添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の  $70\%$  エタノール溶液  $10 \text{ ml}$  添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

(2)  $56^\circ\text{C}$ 、 $30$  分間処理した牛胎児血清を  $10\%$  含む  $\text{RPMI } 1640$  培地にて  $37^\circ\text{C}$  で培養した  $\text{HL}-60$  を  $\text{RPMI } 1640$  培地にて  $2.5 \times 10^5$  コ／ $5 \text{ ml}$  となるように懸濁した。

この懸濁液  $5 \text{ ml}$  に対し、４，５－ジヒドロキシ－２－ペンテナールの  $12.5 \text{ mM}$ 、 $25 \text{ mM}$ 、 $50 \text{ mM}$ 、若しくは  $100 \text{ mM}$   $70\%$  エタノール水溶液、４－ヒドロキシ－２－シクロペンテン－１－オンの  $0.05 \text{ mM}$ 、 $0.5 \text{ mM}$ 、 $5 \text{ mM}$ 、若しくは  $50 \text{ mM}$   $70\%$  エタノール水溶液、実施例 ４－（４）で調製した４－（９－アデニル）－２－シクロペンテン－１－オンの  $5 \text{ mM}$ 、 $10 \text{ mM}$ 、若しくは  $20 \text{ mM}$   $70\%$  エタノール水溶液、実施例 ４－（５）で調製した４－（９－グアニル）－２－シクロペンテン－１－オンの  $2.5 \text{ mM}$ 、 $5 \text{ mM}$ 、 $15 \text{ mM}$ 、若しくは  $25 \text{ mM}$   $70\%$  エタノール水溶液、実施例 ５－（２）で調製した１，５－エポキシ－１－ヒドロキシ－３－ペンテン－２－オンの  $75 \text{ mM}$ 、 $150 \text{ mM}$ 、若しくは  $300 \text{ mM}$   $70\%$  エタノール水溶液、又は実施例 ６－（２）で調製した２－（トランス－３，４－ジヒドロキシ－１－ブテニル）－４－（トランス－２－ホルミルビニル）－１，３－ジオキサランの  $5 \text{ mM}$ 、 $25 \text{ mM}$ 、若しくは

胞工學別開実験プロトコールシリーズアポトーシス実験プロトコール、第 129

995年羊土社発行、バイオマニュアルUPシリーズ 最新アポトーシス実験法、第61～63頁に記載の方法でDNAの断片化の解析を行った。

その結果、最終濃度50  $\mu$ M以上の4,5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、最終濃度10  $\mu$ M以上の4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、最終濃度10  $\mu$ M以上の4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、最終濃度20  $\mu$ M以上の4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、最終濃度600  $\mu$ M以上の1,5-エポキシ-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オン、又は最終濃度50  $\mu$ M以上の2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランの添加培養細胞にアポトーシス細胞を確認した。また最終濃度50、100、200  $\mu$ Mの4,5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、最終濃度10  $\mu$ Mの4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、最終濃度10、30  $\mu$ Mの4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン添加培養細胞にDNAの断片化を確認した。なお対照の70%エタノール溶液10  $\mu$ l添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

(3) 実施例9-(2)と同様の方法で24時間培養した細胞を一部サンプリングし、0.4%トリパンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察し、染色されていない生細胞と青く染色された死細胞の細胞数の測定を行い、生残率が50%になる各サンプルの濃度(生残率<sub>50</sub>)を求め、表1に示した。

表 1

物質名	生残率 <sub>50</sub> (μM)
4, 5-ジヒドロキシ- 2-ベンテナール	124
4-ヒドロキシ-2-シ クロペンテン-1-オン	25.5
4-(9-アデニル)-2 -シクロペンテン-1-オン	22.4
4-(9-グアニル)-2 -シクロペンテン-1-オン	67.9
1, 5-エポキシ-1-ヒドロ キシ-3-ペンテン-2-オン	438
2-(トランス-3, 4-ジヒドロ キシ-1-ブテニル)-4-(ト ランス-2-ホルミルビニル)- 1, 3-ジオキサラン	74.4

## 実施例 13

(1) トポイソメラーゼ II〔トボジェン社製、2単位/μl〕2 μl、10倍濃度緩衝液〔0.5M Tris-HCl (pH 8.0)、1.2M KCl、0.1M MgCl<sub>2</sub>、5mM アデノシン三リン酸、5mM ジチオスレイトール〕2 μl、0.1% ウシ血清アルブミン (宝酒造社製) 2 μl、蒸留水 11 μl 及び対照の蒸留水又は水で様々な濃度に調製した 4, 5-ジヒドロキシ-2-ベ

を添加して 37°C で反応させた。30 分間反応後、1% トリス・硫酸ナトリウム (0.01% トリス・硫酸ナトリウム、0.01% 酢酸ナトリウム、0.01% 酢酸ナトリウム) を添加

して反応を停止した。

アガロース L03 (宝酒造社製) と TAE 緩衝液 (40 mM Tris、5 mM 酢酸ナトリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) ニナトリウム、酢酸で pH 7.8 に調整) を用いて作製した 1% アガロースゲルに上記反応液 20  $\mu$ l をアプライし、TAE 緩衝液中で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 1  $\mu$ g/ml エチジウムブロミド水溶液に浸漬し、紫外線を照射して DNA 電気泳動パターンを観察した。なお、水添加の対照では DNA が超らせん型から弛緩型に完全に変化するが、トポイソメラーゼ II 活性が阻害されると超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害される。

その結果、水添加の対照では DNA が超らせん型から弛緩型に完全に変化した。100  $\mu$ M 以上の 4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンによって DNA の超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害され、各化合物のトポイソメラーゼ II 阻害活性が確認された。

(2) 実施例 13-(1) と同様の方法で各化合物のトポイソメラーゼ I 阻害活性を測定した。但し、トポイソメラーゼ II の代りにトポイソメラーゼ I (トポジェン社製、0.01 単位/ $\mu$ l)、10 倍濃度緩衝液として 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)、10 mM EDTA ニナトリウム、1 mM スペルミジン、50% グリセロールを用いた。

その結果、各化合物にトポイソメラーゼ I 阻害活性は確認できなかった。

以上、正常細胞では分裂期の一過的に発現しているが、がん化により全細胞周期を通じて高発現するようになるトポイソメラーゼ II に対し各化合物は特異的な阻害活性を示した。また、他の本発明の化合物も同様の阻害活性を示した。

#### 実施例 14

ヒト細胞株である Hs68 細胞 (ATCC CRL-1635) を 10% ウシ胎児血清 (FBS: バイオウイタッカー社製) を含む D-MEM 培地 (ギブコ BRL 社製) にて、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で細胞が培養器に飽和になるまで培養し、トリプシン-EDTA 溶液 (バイオウイタッカー社製) で細胞を 3  $\times$  10

5 個/ml となるように上記培地に懸濁し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに200  $\mu$ l ずつ分注した。培養5日後、ほぼ細胞が培養器に飽和になった時点で培地を捨て、5、10、20、40、100又は200  $\mu$ M 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを含有する培地を加えた。96時間のタイムコースを取って、24時間ずつ経時的に培養上清を回収し、Hs68細胞におけるhIGF-1産生誘導に対する4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの影響をhIGF-1のELISAキット（グイアグノステックス システム ラボ 社製）を用いて測定した。

その結果、Hs68細胞において、100  $\mu$ M以上の4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを添加した場合には、hIGF産生誘導活性は24時間目に最大となり、それから経時的に減少した。なお、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールと比較して4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンのhIGF-1誘導活性が強かった。

その結果を表2と表3に示す。

表2

4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
濃度 ( $\mu$ M)	hIGF-1産生誘導活性 (ng/ml)			
0	0	0	0	0
10	0	0	0	0

表 3

4, 5-ジヒドロキシ -2-ペンテナール	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
濃度 ( $\mu\text{M}$ )	h I G F - 1 産生誘導活性 ( $\text{ng/ml}$ )			
0	0	0	0	0
40	0	0	0	0
100	15.3	10.0	5.2	4.6
200	11.3	11.1	9.9	4.5

以上、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンはh I G F - 1 産生誘導活性を示した。また、他の本発明の化合物も同様の活性を示した。

#### 実施例 15

(1) 組織性リンパ腫患者の胸水から樹立された滑膜細胞株であるU937細胞(ATCC CRL-1593)を10%FBSを含有するRPMI1640培地に $5 \times 10^5$  個/mlとなるように懸濁し、96穴マイクロタイタープレート of 各ウェルに100  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。更に、上記の培地を100  $\mu\text{l}$  加え、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを50、75、100、150又は200  $\mu\text{M}$  を含有するように加えた。これを37°C炭酸ガス存在下で培養し、24、48、72時間後、10  $\mu\text{l}$  のプレミックスWST-1(宝酒造社製、MK400)を加えて、37°Cで3時間反応させ、450 nmにおける吸光度( $A_{450}$ )から650 nmにおける吸光度( $A_{650}$ )を差し引いた値( $A_{450-650}$ )を細胞増殖度とした。

その結果を表4と表5に示す。

表 4

4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン	培養時間		
	24時間	48時間	72時間
濃度 ( $\mu$ M)	細胞増殖度 ( $A_{450-650}$ )		
0	0.940	3.912	1.829
50	0.501	0.930	0.875
75	0.557	0.968	0.821
100	0.591	1.054	0.532
150	0.524	1.126	0.478
200	0.353	0.643	0.338

表 5

4,5-ジヒドロキシ -2-ペンテナール	培養時間		
	24時間	48時間	72時間
濃度 ( $\mu$ M)	細胞増殖度 ( $A_{450-650}$ )		
0	0.940	3.912	1.829
50	0.821	1.471	1.245
75	0.606	0.879	0.862
100	0.560	0.948	0.597
150	0.505	0.823	0.465
200	0.370	0.644	0.753

（１）ヒト慢性リウマチ患者の滑膜から樹立された繊維芽細胞株であるDSE  
 のに化合物同様の活性を認めた

（２）ヒト慢性リウマチ患者の滑膜から樹立された繊維芽細胞株であるDSE

K細胞（*in vitro* のリウマチモデルとして、埼玉医科大学総合医療センター第二内科保有）を10%FBS（バイオウイタッカー社製）を含むIscoV-MEM培地（IMDM：ギブコBRL社製）にて、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で細胞が培養器に飽和になるまで培養し、トリプシン-EDTA溶液（バイオウイタッカー社製）で細胞を $3 \times 10^4$  個/mlとなるように上記培地に懸濁し、96穴マイクロタイタープレート（FALCON社製）の各ウェルに200 $\mu$ lずつ分注した。培養5～7日後、ほぼ細胞が80%飽和になった時で培地を交換し、50、75、100、150 $\mu$ Mの4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、又は4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールを含有する200 $\mu$ lの上記培地を加えた。

96時間のタイムコースを取って、24時間ずつ経時的に10 $\mu$ lのプレミックスWST-1（宝酒造社製、MK400）を加えて37℃で3.5時間反応させ、450nmにおける吸光度（A<sub>450</sub>）から650nmにおける吸光度（A<sub>650</sub>）を差し引いた値（A<sub>450-650</sub>）を細胞増殖度とした。

その結果を表6と表7に示す。

またA<sub>450-650</sub>のデータによって求められた半数細胞増殖抑制濃度-I C<sub>50</sub>を表8に示す。

表6

4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン 濃度 ( $\mu$ M)	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
	細胞増殖度 (A <sub>450-650</sub> )			
0	1.04	1.25	1.46	2.35
50	0.57	0.71	0.73	0.54
75	0.51	0.68	0.68	0.55
100	0.50	0.64	0.67	0.51
150	0.46	0.55	0.63	0.50



表 7

4, 5-ジヒドロキシ -2-ペンテナール	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
濃度 ( $\mu\text{M}$ )	細胞増殖度 ( $A_{450-650}$ )			
0	1.04	1.25	1.46	2.33
50	1.12	0.83	0.96	0.98
75	1.11	0.77	0.67	0.59
100	1.02	0.63	0.54	0.59
150	0.96	0.61	0.41	0.55

表 8

I C <sub>50</sub>	4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン		4, 5-ジヒドロキシ-2- ペンテナール	
	48時間	96時間	48時間	96時間
濃度 ( $\mu\text{M}$ )	60	35	165	75

(3) 実施例 15-(2) に記載の条件で D S E K 細胞を調整し、25、50、75、100、200、又は 400  $\mu\text{M}$  の 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-クアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、又は 2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブチル)-2-シクロペンテン-1-オン、を含有する 20

72時間の培養液を取り出し、24時間ごとに細胞増殖度を測定し、また各化合物の I C<sub>50</sub> を求めた。

その結果を表 9 に示す。

表 9

物質名	I C <sub>50</sub> (μM)	
	2 4 時間	7 2 時間
4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン	2 0 7	6 0
4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール	2 3 2	1 1 9
4-(9-クアニル)-2-シクロペンテン-1-オン	1 3 2	6 7
2-(トランス-3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキソラン	2 6 7	6 8

試料無添加の対照の 2 4 時間目、7 2 時間目の増殖度はそれぞれ 3. 9 5、3. 9 7 であった。

以上、インビトロ ( in vitro ) でのリウマチモデル-D S E K 細胞において、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-クアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、又は 2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキソランを添加した場合、P B S 添加の対照区と比べて各化合物添加区はリウマチ細胞の増殖が強く抑制された。また、経時的な観察において、これらの化合物は増殖抑制活性を継続するのみならず、経時的に活性を増強する傾向が認められた。

以上の結果によって、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロ

キシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-フテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランは強い抗リウマチ活性があり、慢性リウマチに対する有用な治療薬と健康食品として開発されることが期待される。また、他の本発明の化合物も同様の抗リウマチ活性を示した。

また、DSEK細胞培養において、24時間ずつ経時的に $150\mu\text{l}$ /ウエルの培養上清を回収し、この細胞のサイトカン(ヒトTGF- $\beta$ 、ヒトFGF- $\beta$ 、ヒトIL-1 $\alpha$ 及びヒトIL-10)産生に対する、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、又は4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールの影響を、それぞれのサイトカインに特異的なELISA-Kit(ヒトFGF- $\beta$ とヒトIL-10、INTERGEN社製；ヒトIL-1 $\alpha$ とヒトTGF- $\beta$ 、Promega社製)を用いて測定した。

その結果、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンはヒトFGF- $\beta$ 及びヒトIL-1 $\alpha$ の産生を抑制した。4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オンはヒトTGF- $\beta$ とヒトFGF- $\beta$ の産生を抑制し、ヒトIL-1 $\alpha$ の産生を活性化した。2-(3,4-ジヒドロキシ-1-フテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランはヒトIL-1 $\alpha$ の産生を活性化した。4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールはヒトIL-1 $\alpha$ 及びヒトIL-10の産生を活性化した。

#### 実施例16

原発性肝芽細胞腫ヘパトблаストーマ患者から樹立された細胞株であるHep G2細胞(ATCC HB-8065)を10%FBS(バイオウイタッカー社製)を含有するDMEM培地(ギブコ社製)に $3.8 \times 10^3$  個/ $\text{ml}$ となるように懸濁し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに $200\mu\text{l}$ ずつ分注

した。24時間後、培養上清を回収し、この細胞のサイトカン(ヒトTGF- $\beta$ 、ヒトFGF- $\beta$ 、ヒトIL-1 $\alpha$ 及びヒトIL-10)産生に対する、4-ヒドロキシ-2-ペンテナールを25、50、100又は $150\mu\text{M}$ 含有する

培養液に24時間作用させた。作用後、培養上清を回収し、ELISA-Kitを用いて測定した。

(宝酒造社製、MK 400)を加えて、37℃で3時間反応させ、450 nmにおける吸光度 ( $A_{450}$ ) から650 nmにおける吸光度 ( $A_{650}$ ) を差引いた値 ( $A_{450-650}$ ) を細胞増殖度とした。

その結果を表10と表11に示す。

表10

4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン	培養時間		
	24時間	48時間	72時間
濃度 ( $\mu$ M)	細胞増殖度 ( $A_{450-650}$ )		
0	3.47	2.96	2.57
25	1.30	0.70	0.49
50	1.38	0.81	0.47
100	1.31	0.56	0.35
150	1.23	0.43	0.30

表11

4,5-ジヒドロキシ- 2-ペンテナール	培養時間		
	24時間	48時間	72時間
濃度 ( $\mu$ M)	細胞増殖度 ( $A_{450-650}$ )		
0	3.47	2.96	2.57
25	3.39	2.69	1.70
50	1.97	2.96	1.70
100	1.81	2.70	0.89
150	1.40	0.79	0.35

以上、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び4,5-ジヒドロ

キシ-2-ペンテナールはヒトヘパト بلاストーマ Hep G 2 細胞に対し、がん細胞増殖抑制活性を示した。また、他の本発明の化合物も同様の活性を示した。

#### 実施例 17

(1) 10%ウシ胎児血清(ギブコ社製)含有、フェノールレッド不含、2 mM L-グルタミン(ライフテックオリエンタル社製、25030-149)含有ダルバッコ改良イーグル培地(バイオウィーカー社製、12-917F)にRAW264.7細胞(ATCC TIB 71)を $3 \times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、48穴マイクロタイクープレーートのウェルに500  $\mu$ lずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37°Cで12時間培養した。ウェルに10  $\mu$ lの50  $\mu$ g/mlリボポリサッカライド(LPS、シグマ社製、L-2012)又は2.5  $\mu$ g/ml LPSと500ユニット/ml インターフェロ $\gamma$ (シエンザイム社:コードMG-IFN)の各10  $\mu$ lを加え、更に10  $\mu$ lの1000、500、又は250  $\mu$ M 2-(トランス-3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソラン水溶液を添加して更に18時間培養した後、NO $_2^-$ が培地中で酸化されることによって生ずるNO $_3^-$ 濃度の測定を行った。なお、対照としてLPSとインターフェロ $\gamma$ を加えない区分及び2-(トランス-3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソランを加えない区分を設定した。

上記培養後、100  $\mu$ lの培地に100  $\mu$ lの4%グリース試薬(シグマ社製、G4410)を加え、室温で15分間放置した後、490 nmにおける吸光度を測定した。上記培地に溶解した既知の濃度のNaNO $_3$ で作製した検量線から培地中のNO $_3^-$ 濃度を計算した。測定はすべて3連で行った。

この結果、2-(トランス-3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(

制した。

ロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランを添加して各培養条件で培養した時の培地中のNO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度を示す図である。図14において横軸は培養条件を、縦軸はNO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度(μM)を示す。なお図中2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランは単にジオキサランと記載する。

2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランは細胞増殖抑制が全く認められない濃度である最終濃度10 μMでも、約50%のNO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度抑制活性を示した。この結果は、2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランによるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度抑制が、2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランによる細胞増殖抑制に起因するものではないことを示している。また、他の本発明の化合物も同様の活性を示した。

#### 実施例18

2 × 10<sup>5</sup> 細胞/mlのHL-60(ATCC CCL-240)を含む10% FBS含有RPMI 1640培地5 mlを6穴プレートの各ウェルに入れ、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で24時間培養した後、最終濃度が、0、12.5、25、50、若しくは100 μMになるように4,5-ジヒドロキシー-2-ペンテナールを、又は、最終濃度が、0、2.5、5、10、20、40、若しくは80 μMになるように4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンを添加し、更に6時間培養を続けた。

培養終了後、細胞数を計測した後、細胞を遠心分離で回収し、PBSで洗浄して、各試料処理細胞を調製した。また、45℃、5分間熱処理を行った後、同様に培養した細胞も調製した。

これらの処理細胞を用い、モレキュラー クローニング (Molecular Cloning) [コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989)] 記載の方法に従ってSDS-PAGEを行った。処理

細胞は、 $2.5 \times 10^6$  細胞/ml になるように SDS-PAGE Sample buffer に懸濁し、この細胞懸濁液を  $100^\circ\text{C}$  で 10 分間処理した後、 $5 \mu\text{l}$  ずつを 2 枚の SDS-PAGE ゲル（5% スタッキングゲル、10% セパレーションゲル）にアプライし、電気泳動を行った。一方のゲルは、クマシー染色し、他方のゲルは、Polyvinylidene difluoride transfer membrane [Immobilon™: ミリポア (MILLIPORE) 社製 Cat.# IPVH000-10] にブロッティングした。このメンブレンを Block Ace (大日本製薬株式会社 Cat.# UK-B25) で  $4^\circ\text{C}$  一晩ブロッキングした。

このブロッキングしたメンブレンに熱誘導される 70kDa の熱ショックタンパクと特異的に反応するモノクローナル抗体 HSP 72/73 (Ab-1) [オンコジーン リサーチ プロダクツ (Oncogene Research Products) 社製 Cat.# HSP01] を反応させた後、0.05% Tween20 を含む TBS で洗浄し、更に、TBS で洗浄した。次いで、Peroxidase 複合二次抗体 HRP-Rabbit Anti Mouse IgG (H+L) [ZYMED ラボラトリース社 (ZYMED Laboratories, Inc.) 製 Cat.# 61-6520] を反応させ、先の操作と同様に洗浄した。このように一次抗体、二次抗体と反応させたメンブレンに、ケミルミノール試薬 RENAISSANCE™ [デュポン NEN (Dupont NEN) 社製 Cat.# NEL-100] を反応させた後、X-Ray フィルムを感光して 70kDa の熱ショックタンパクの誘導を確認した。

その結果、4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、及び 4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの熱ショックタンパクの誘導が確認された。その誘導の強弱は表 12 と表 13 に示した。なお表 12、表 13 中、+ は誘導の強さを表し、+ が多いほど誘導が強いことを意味する。また - は誘導が認められなかったこと、± は誘導がわずかであることを意味する。また、他の本発明の化合物も同様の熱ショックタンパク誘導活性を示した。

表 1 2

	濃度 ( $\mu$ M)			
	1. 2 5	2 5	5 0	1 0 0
4, 5-ジヒドロキシ- 2-ペンテナール	-	±	+++	-

表 1 3

	濃度 ( $\mu$ M)					
	2. 5	5	1 0	2 0	4 0	8 0
4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1-オン	-	±	+	+++	++	±

ただし、未処理のコントロールは、-、熱処理 45℃、5 分間熱処理は、++ であった。

#### 実施例 1 9 注射剤

実施例 1 記載の D-リボースの加熱処理物の中和物の濃縮乾固物を注射用蒸留水に溶解し、1% 溶液を調製した。この溶液を凍結乾燥用バイアル瓶 1 バイアル中に、上清画分の乾燥物換算で 10 mg 充てんし、凍結乾燥を行った。別に溶解液として生理食塩水 2 ml を添加した。

同様に実施例 2 記載の 2-デオキシ-D-リボースの加熱処理物を用い注射剤を調製した。

同様に 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン又は 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを用い



注射剤を調製した。

#### 実施例 20 錠剤

下記処方に従い錠剤を調製した。

DNAナトリウム塩加熱処理物	10mg
コーンスターチ	65mg
カルボキシメチルセルロース	20mg
ポリビニルピロリドン	3mg
ステアリン酸マグネシウム	2mg
1錠当り	計 100mg

実施例 4 記載の DNA ナトリウム塩加熱処理物の凍結乾燥物を使用した。

同様に 4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン又は 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オンを用い錠剤を調製した。

#### 発明の効果

本発明によればアポトーシス誘発能を有し、がん性疾患においてがん細胞にアポトーシスを誘発し、該疾患の予防、治療に有効な本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、及びアポトーシス誘発能を有する物質である本発明の化合物が提供される。またウロン酸類以外のペントース類からの 4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法が提供される。がん性疾患、とりわけ大腸がん、胃がん等消化器系のがんの場合、本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、アポトーシス誘発能を有する化合物から選択されるものを食品、

を有する化合物から選択されるものを含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は、がん性疾患の予防、治療に有効な効果を示す。また本発明の加熱処理

理物及び／又はその部分精製物、アポトーシス誘発能を有する化合物から選択されるものを有効成分として含有する医薬はがん細胞、滑膜細胞等の異常増殖細胞に増殖抑制活性を有し、生体の恒常性の維持に極めて有用である。またh I G F産生誘導能より、h I G F産生誘導を要する疾患の治療、予防において有用である。また活性酸素の抑制、例えばNO産生抑制を要する疾患の治療、予防に有用である。更に熱ショックタンパク誘導能により、熱ショックタンパク誘導を要する疾患、例えばウイルス性疾患の治療、予防に有用である。

本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、アポトーシス誘発能を有する化合物は食品を原料として安価に大量に供給可能である。また、本発明の加熱処理物及び／又はその部分精製物、アポトーシス誘発能を有する化合物を有効成分として使用することにより、簡便なアポトーシス誘発方法が提供され、該方法を使用することによりアポトーシス機構の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等を行うことができる。

また本発明において本発明の化合物から選択される化合物を有効成分とする医薬が提供され、該医薬はがん疾患、リウマチ、糖尿病、ウイルス病等の難治性の疾患の治療、予防に極めて有用である。

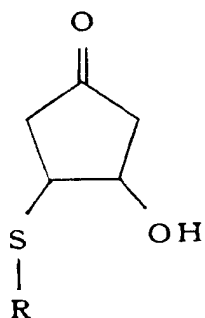
また本発明において本発明の化合物から選択される化合物を含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料が提供され、該食品又は飲料はがん疾患、リウマチ、糖尿病、ウイルス病等の難治性の疾患の予防や症状改善に有用なアポトーシス誘発用、制がん用、抗リウマチ用、抗糖尿病用、熱ショックタンパク誘導用の機能性食品又は飲料である。

更に本発明により、4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの簡便な製造方法が提供される。また、生理活性を有する新規化合物、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン、1, 5-エポキシー-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オン及び一般式〔I〕で表される化合物が提供される。



テンー１－オン、１，５－エポキシ－１－ヒドロキシ－３－ペンテンー２－オン、及び４，５－ジヒドロキシ－２－シクロペンテンー１－オンから選択される化合物である請求の範囲１～９いずれかに記載の製造方法。

11. ４－（９－アデニル）－２－シクロペンテンー１－オン、４－（９－グアニル）－２－シクロペンテンー１－オン、１，５－エポキシ－１－ヒドロキシ－３－ペンテンー２－オン、２－（３，４－ジヒドロキシ－１－ブテニル）－４－（２－ホルミルビニル）－１，３－ジオキサラン、及び下記一般式〔I〕で表される化合物から選択されるアポトーシス誘発性化合物。

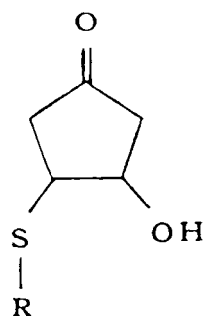


〔I〕

（式中、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である）

12. ４，５－ジヒドロキシ－２－ペンテナール、４－ヒドロキシ－２－シクロペンテンー１－オン、４－（９－アデニル）－２－シクロペンテンー１－オン、４－（９－グアニル）－２－シクロペンテンー１－オン、２－（３，４－ジヒドロキシ－１－ブテニル）－４－（２－ホルミルビニル）－１，３－ジオキサラン、１，５－エポキシ－１－ヒドロキシ－３－ペンテンー２－オン、及び一般式〔I〕で表される化合物から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする４，５－ジヒドロキシ－２－ペンテナール、４－ヒドロキシ－２－シクロペンテンー１－オン、４－（９－アデニル）－２－シクロペンテンー１－オン、４－（９－グアニル）－２－シクロペンテンー１－オン、２－（３，４－ジヒドロキシ－１－ブテニル）－４－（２－ホルミルビニル）－１，３－ジオキサラン、１，５－エポキシ－１－ヒドロキシ－３－ペンテンー２－オン及び一般式〔I〕で表される化合物から選択される化合物に感受性を示す疾病治療用

医薬又は予防用医薬。



[ I ]

13. 医薬が制がん剤、アポトーシス誘発剤、抗リウマチ剤、ヒトインスリン様増殖因子産生誘導剤、活性酸素産生抑制剤、又は熱ショックタンパク誘導剤である請求の範囲12記載の医薬。

14. 下記(a)、(b)、(c)、(d)より選択される少なくとも1種の化合物(但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く)を加熱処理して得られるアポトーシス誘発能を有する加熱処理物及び／又はその部分精製物を含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料。

(a) ペントース、

(b) ペントース誘導体、

(c) ペントースを含有する化合物、

(d) ペントース誘導体を含有する化合物。

15. 制がん用、アポトーシス誘発用、抗リウマチ用、ヒトインスリン様増殖因子産生誘導用、活性酸素産生抑制用又は熱ショックタンパク誘導用である請求の範囲14記載の食品又は飲料。



☒ 1

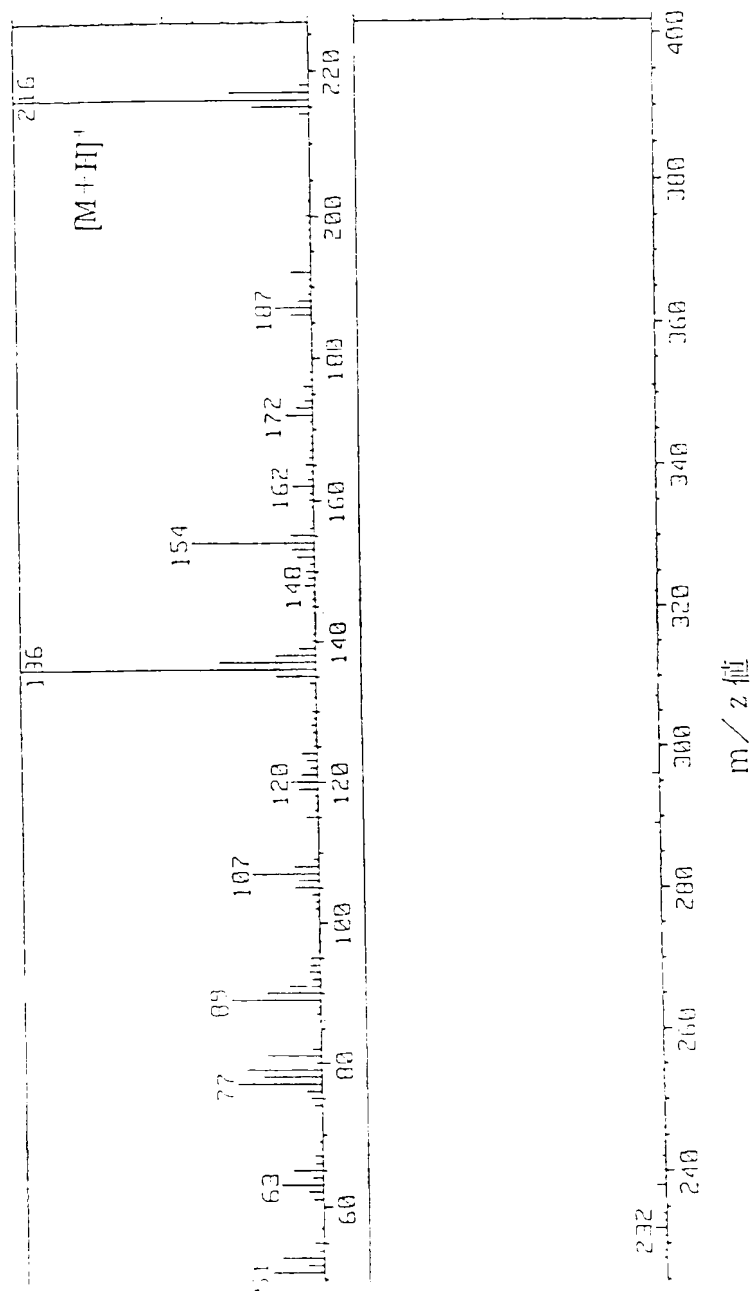
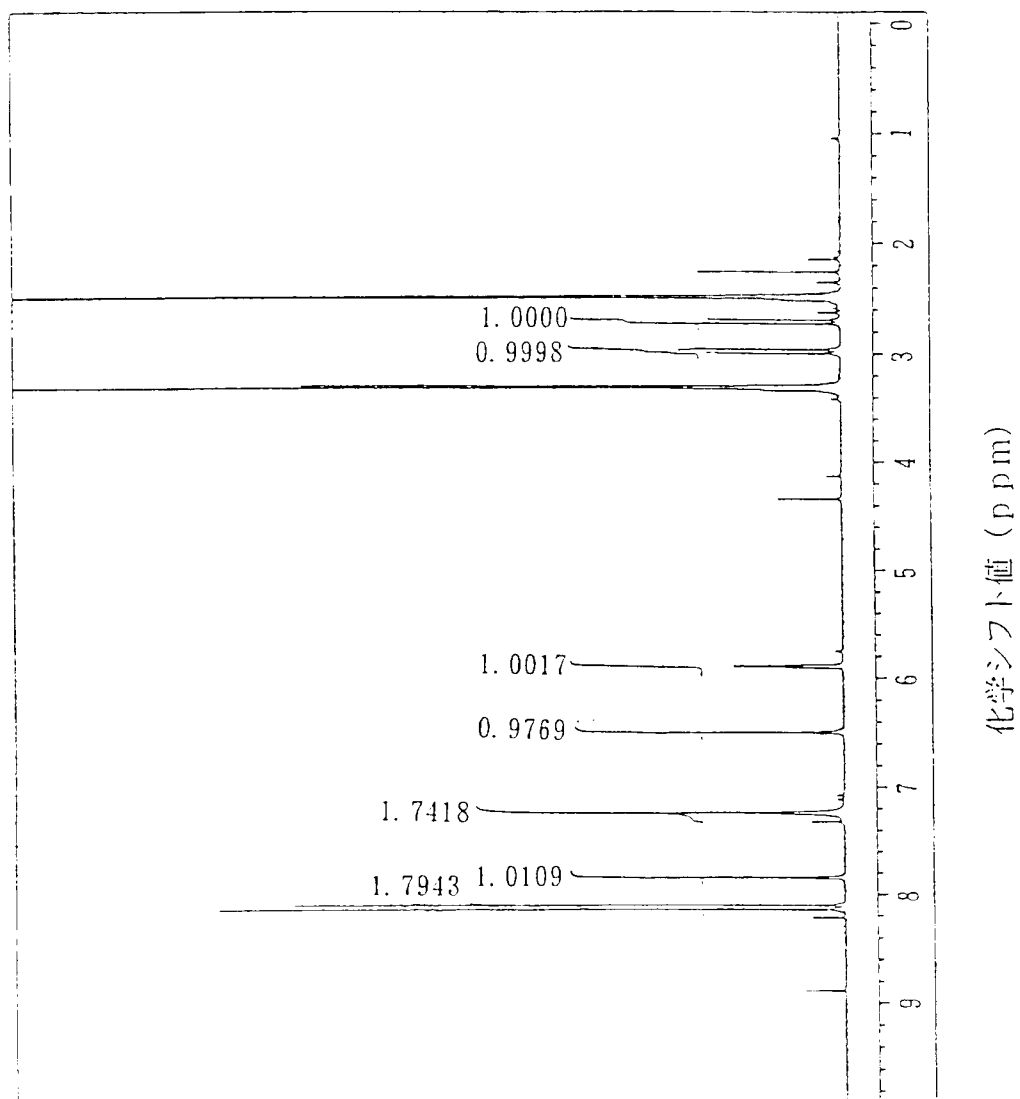






図 2



シグナルの強度



3

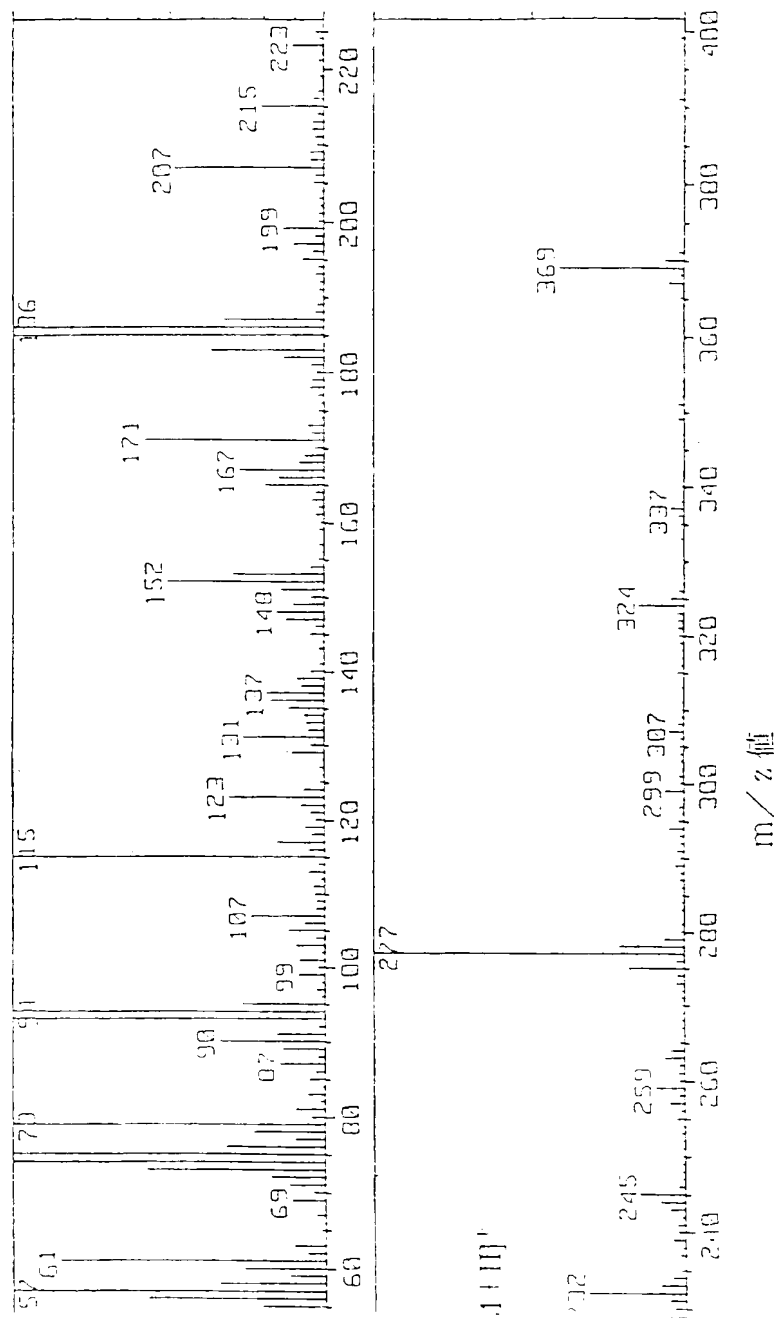
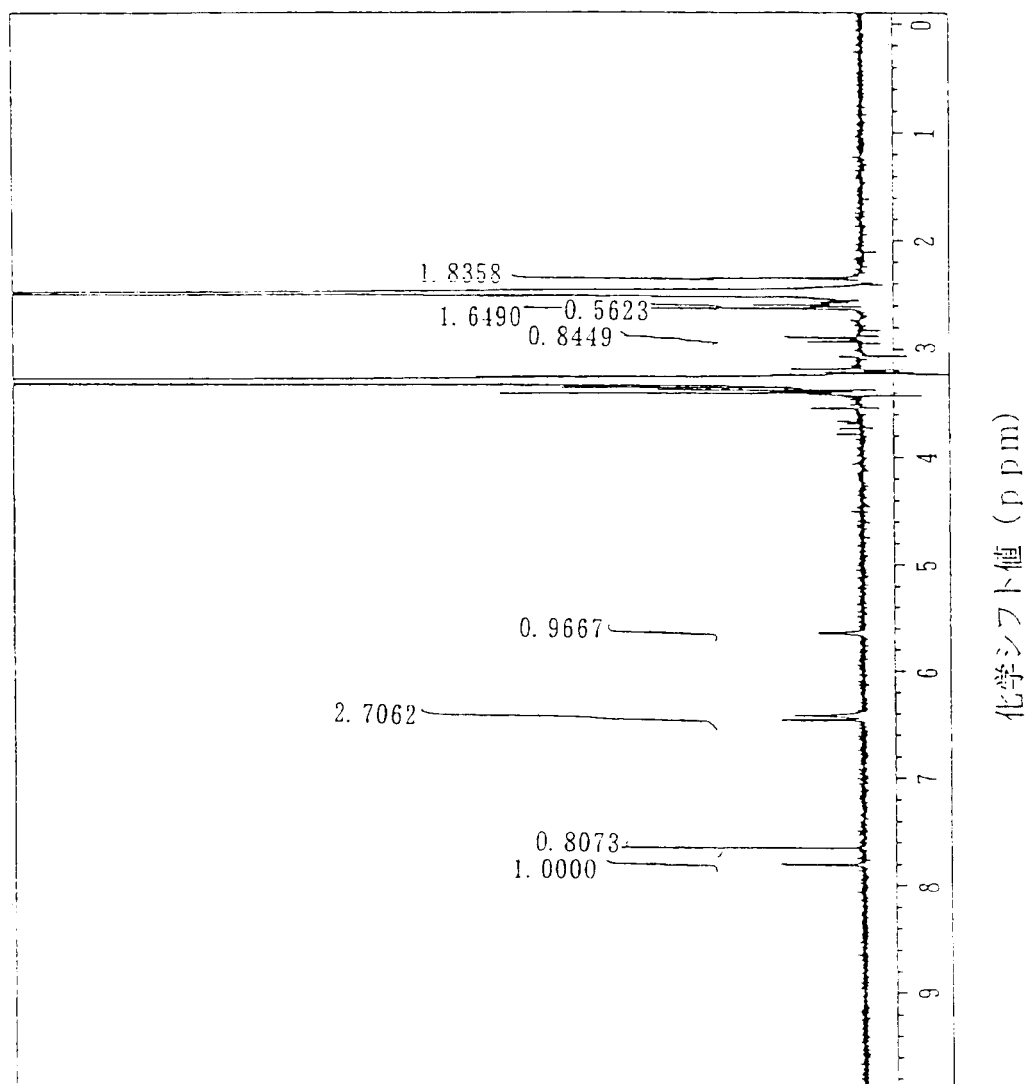




図 4






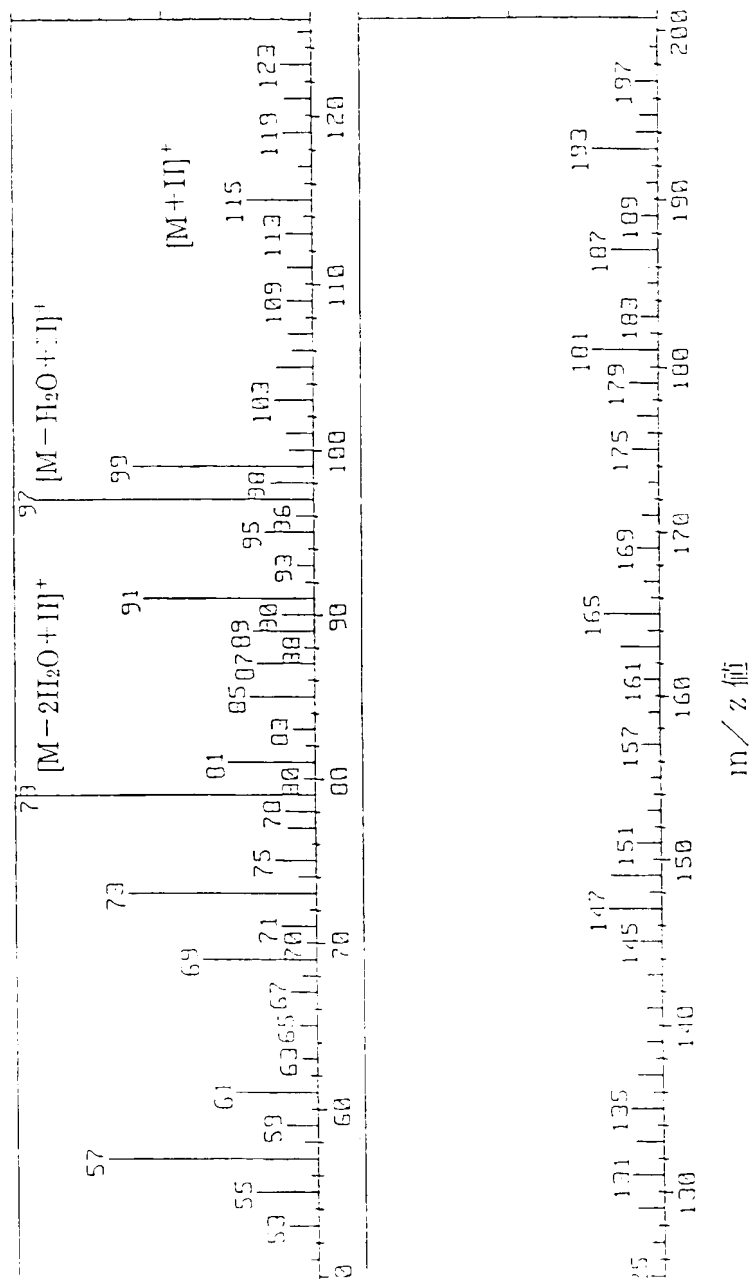
 5





図 6

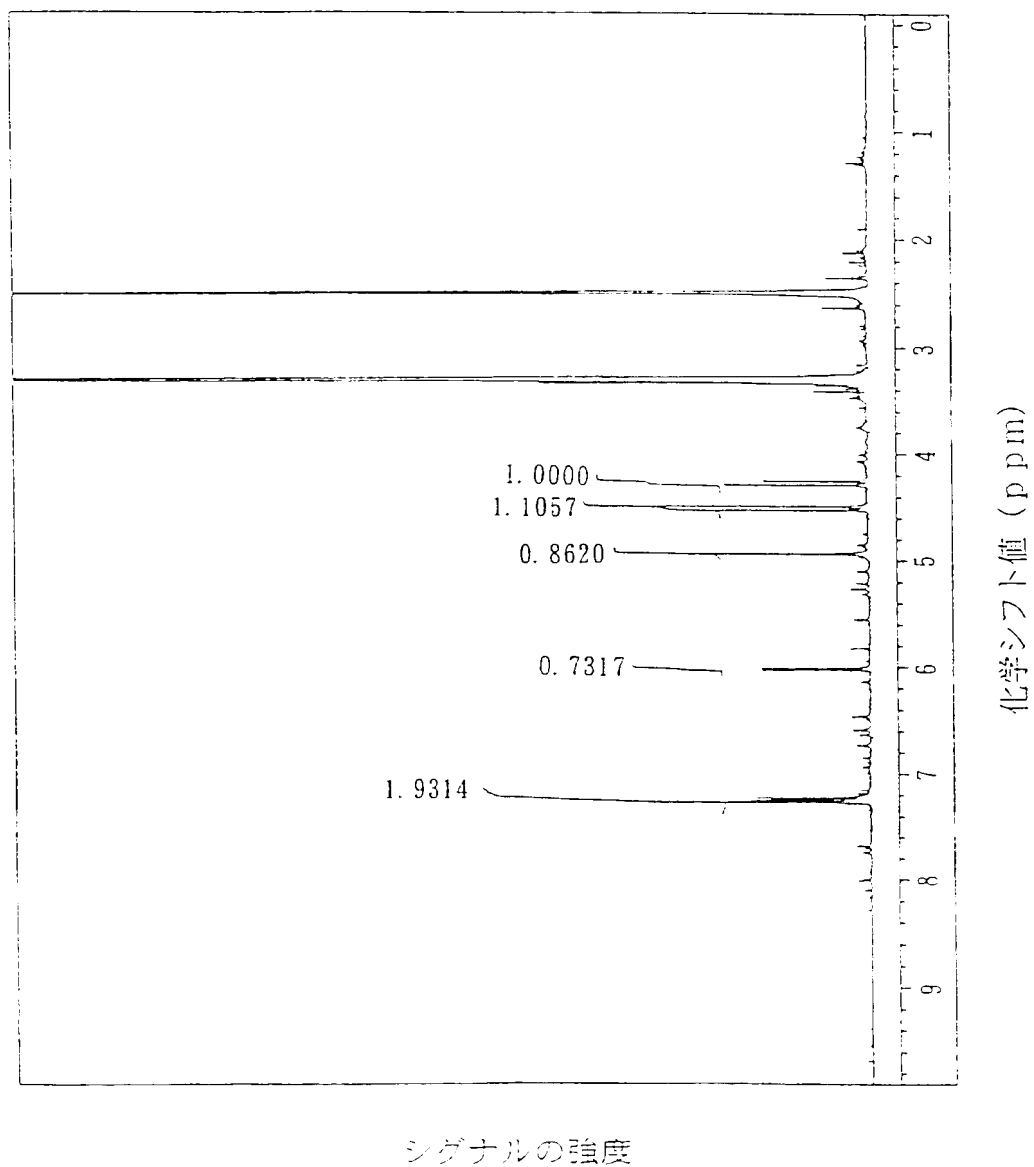




図 7

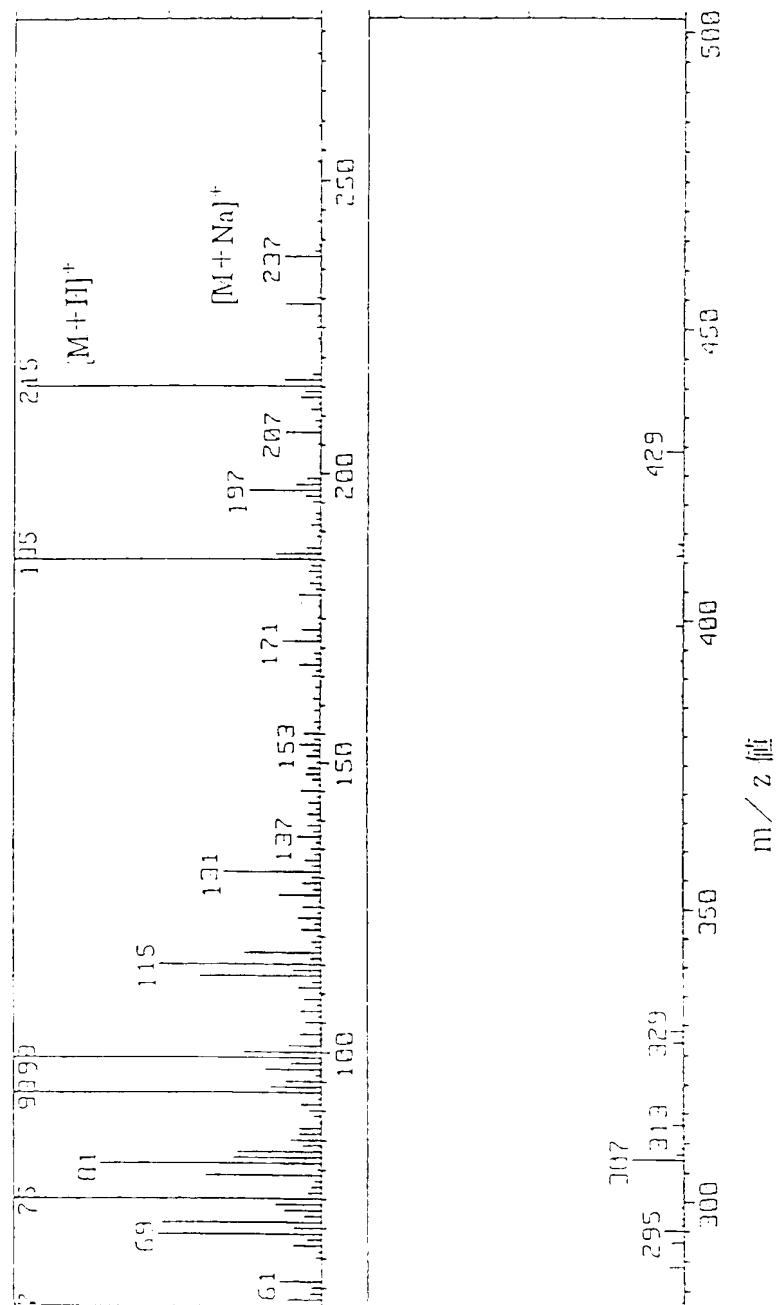
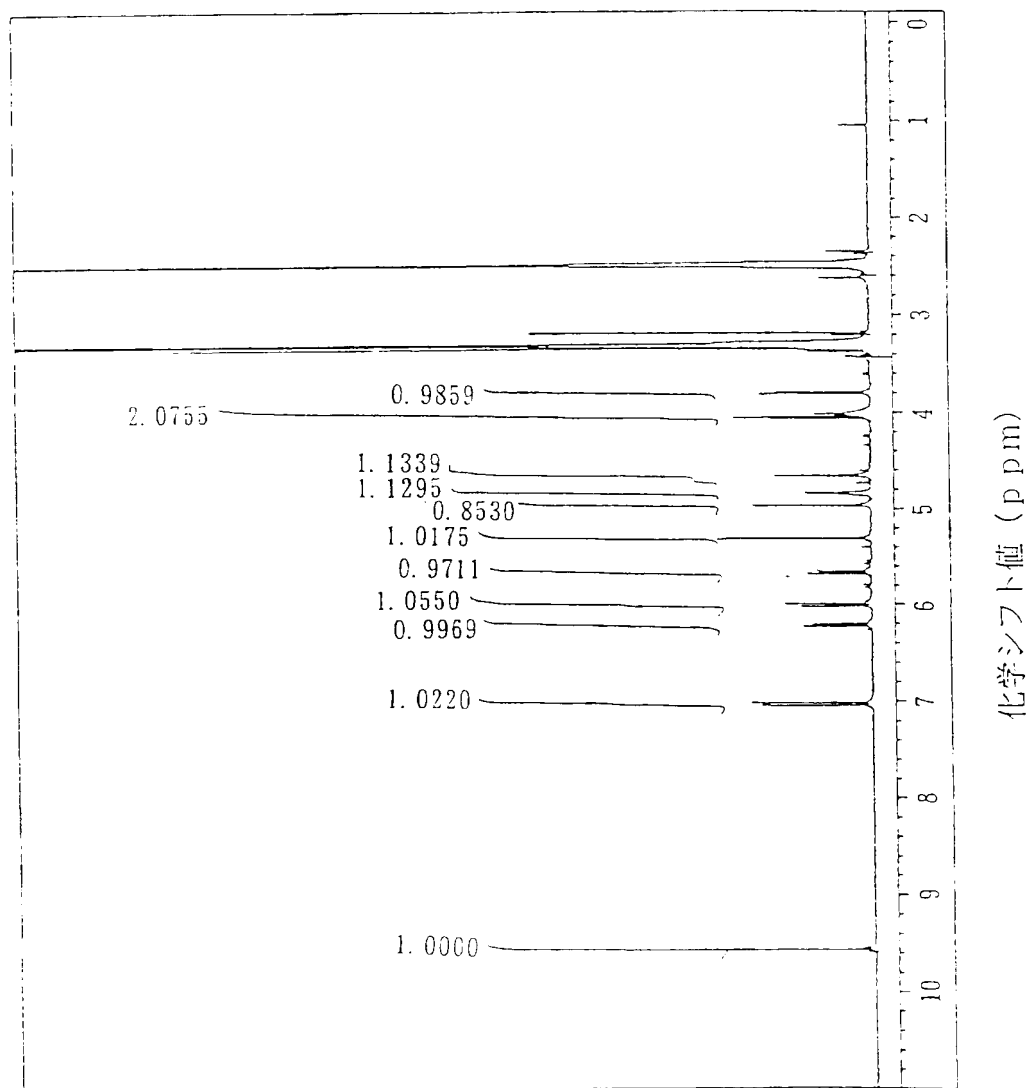




図 8



シグナルの強度



図 9

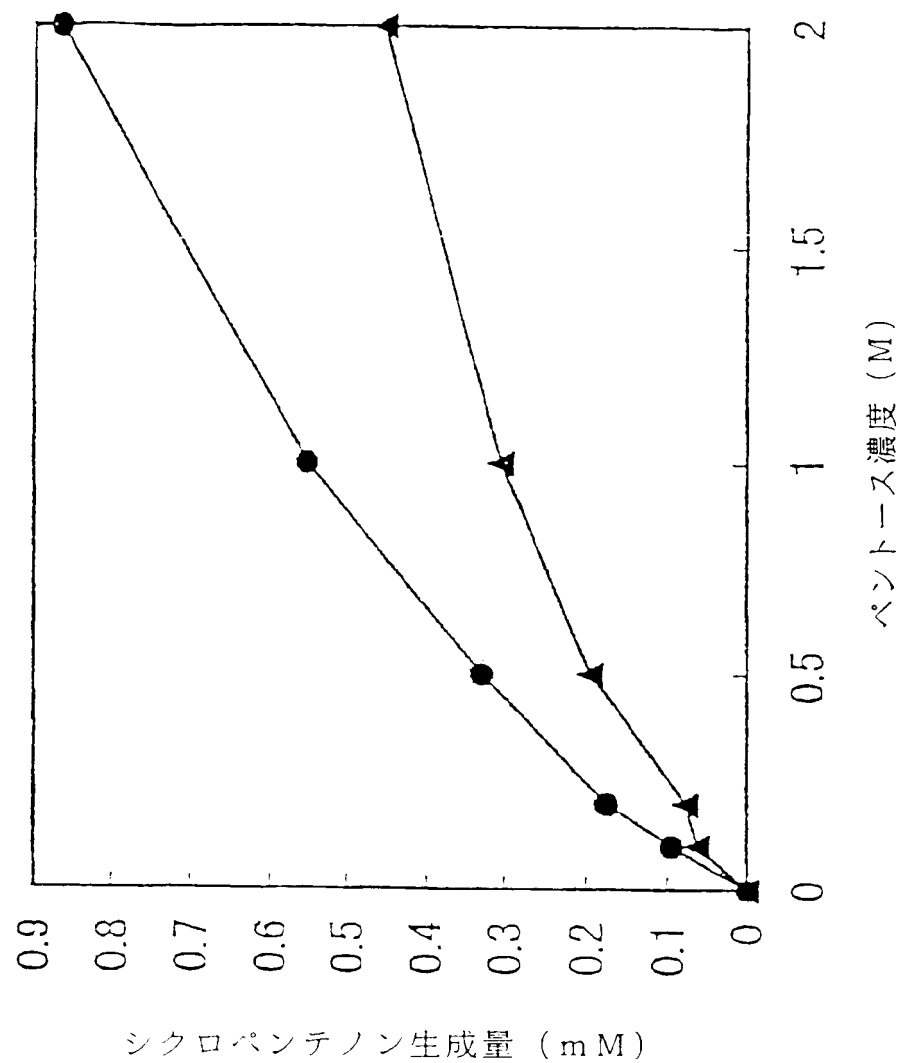






図 10

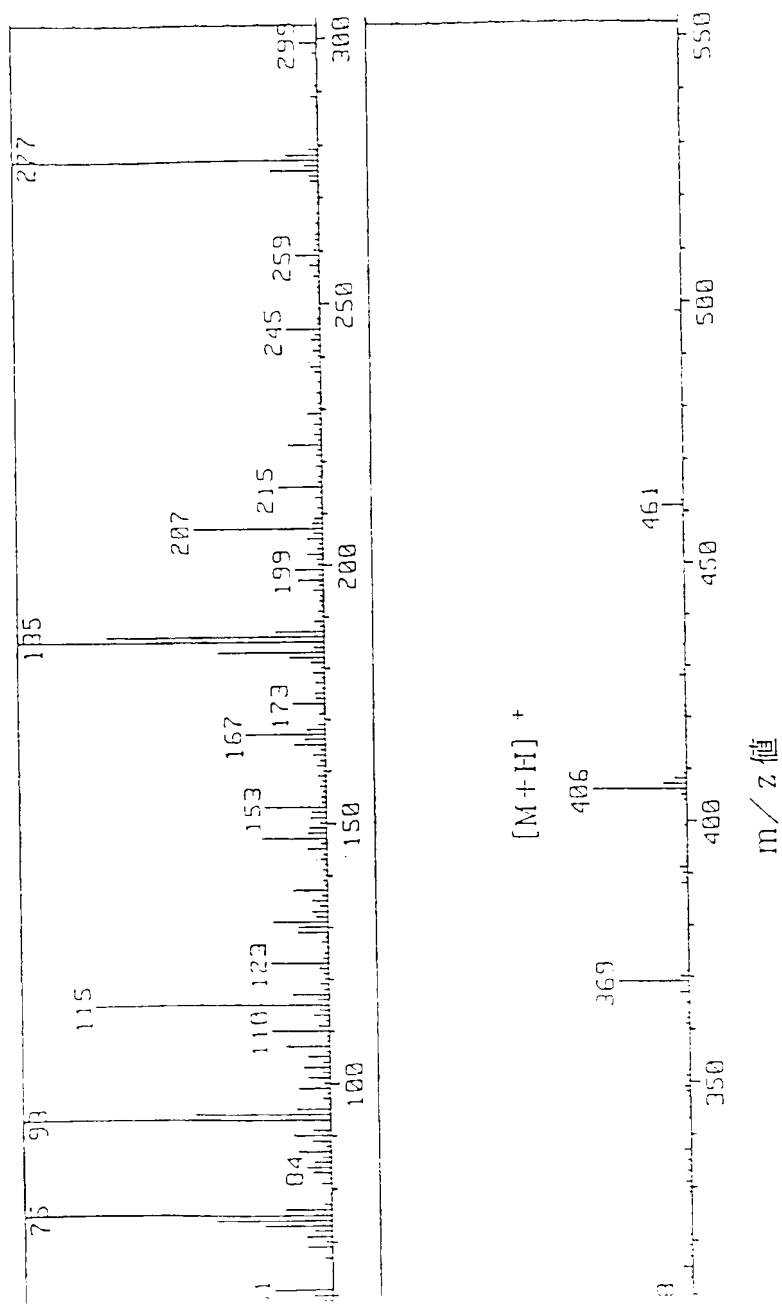




図 1 1

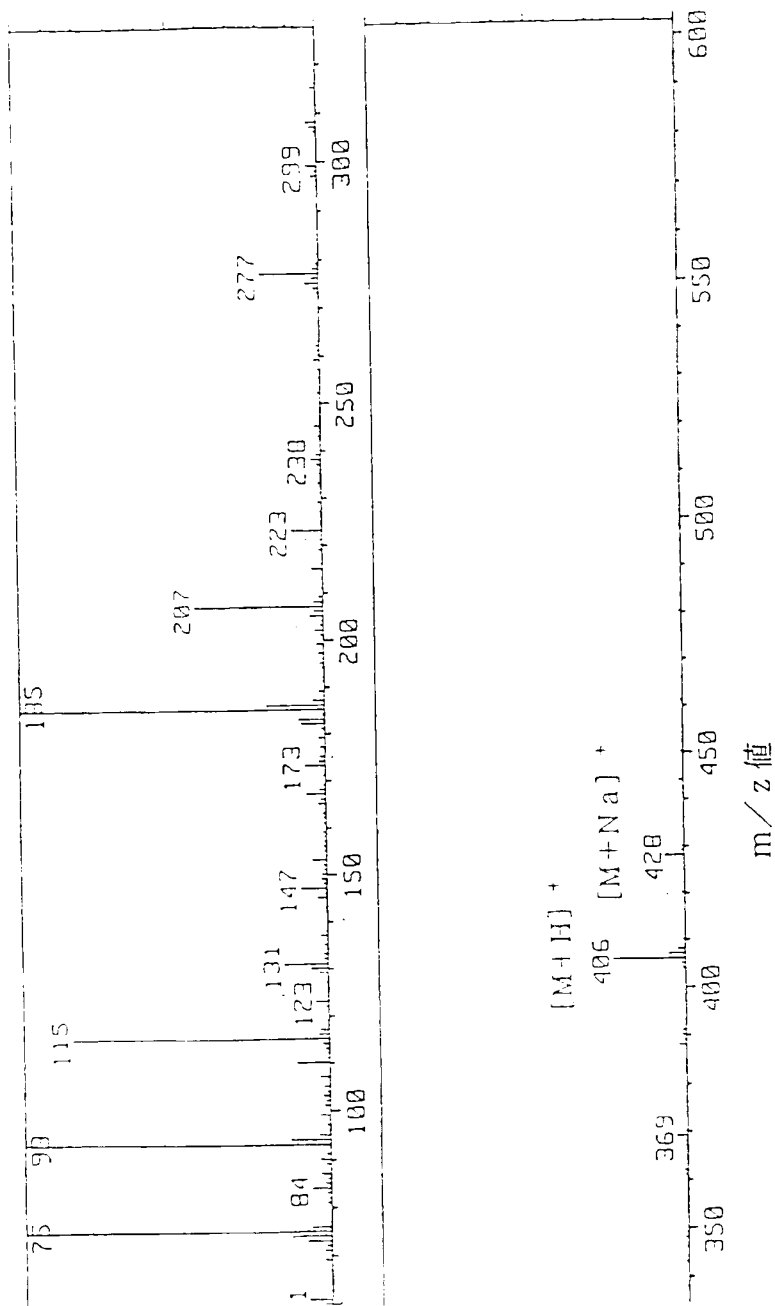
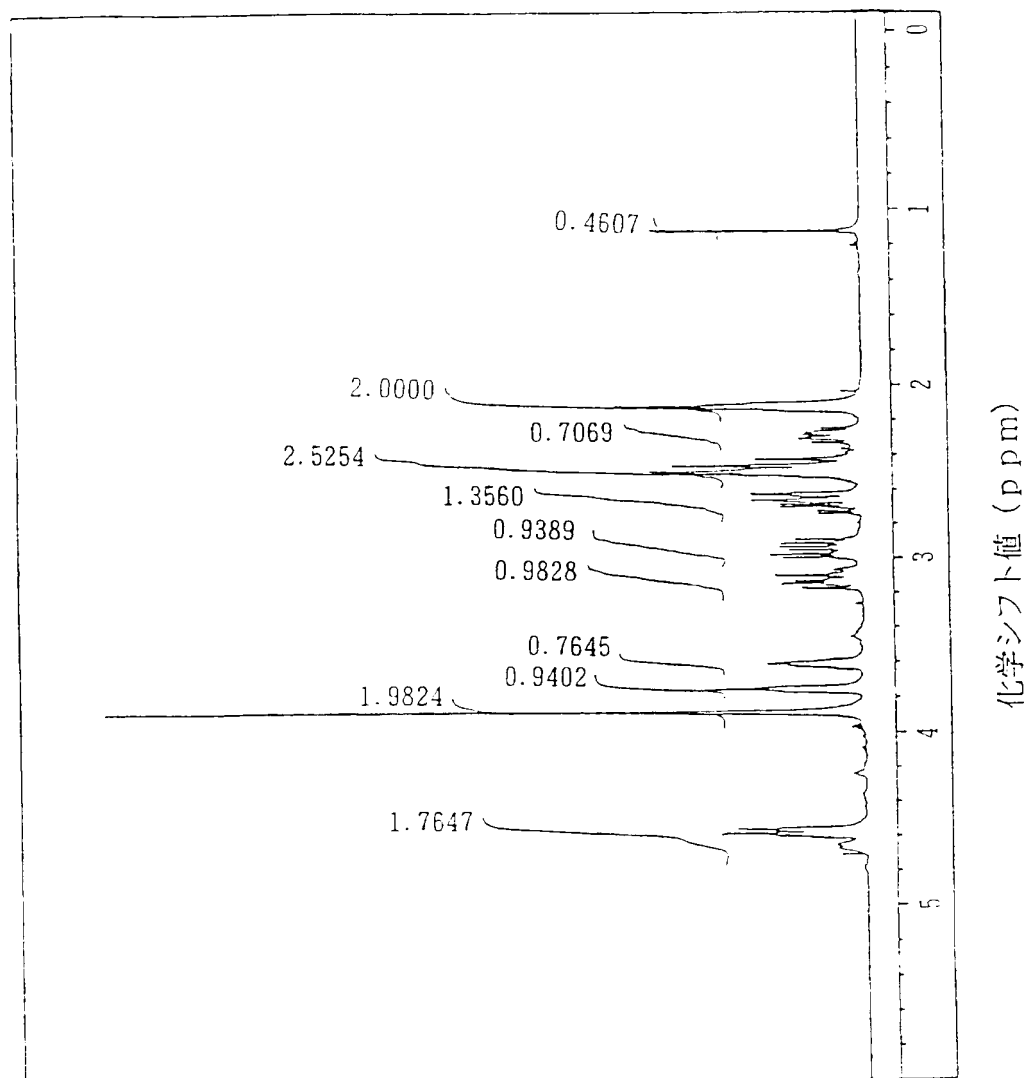


図 1 1



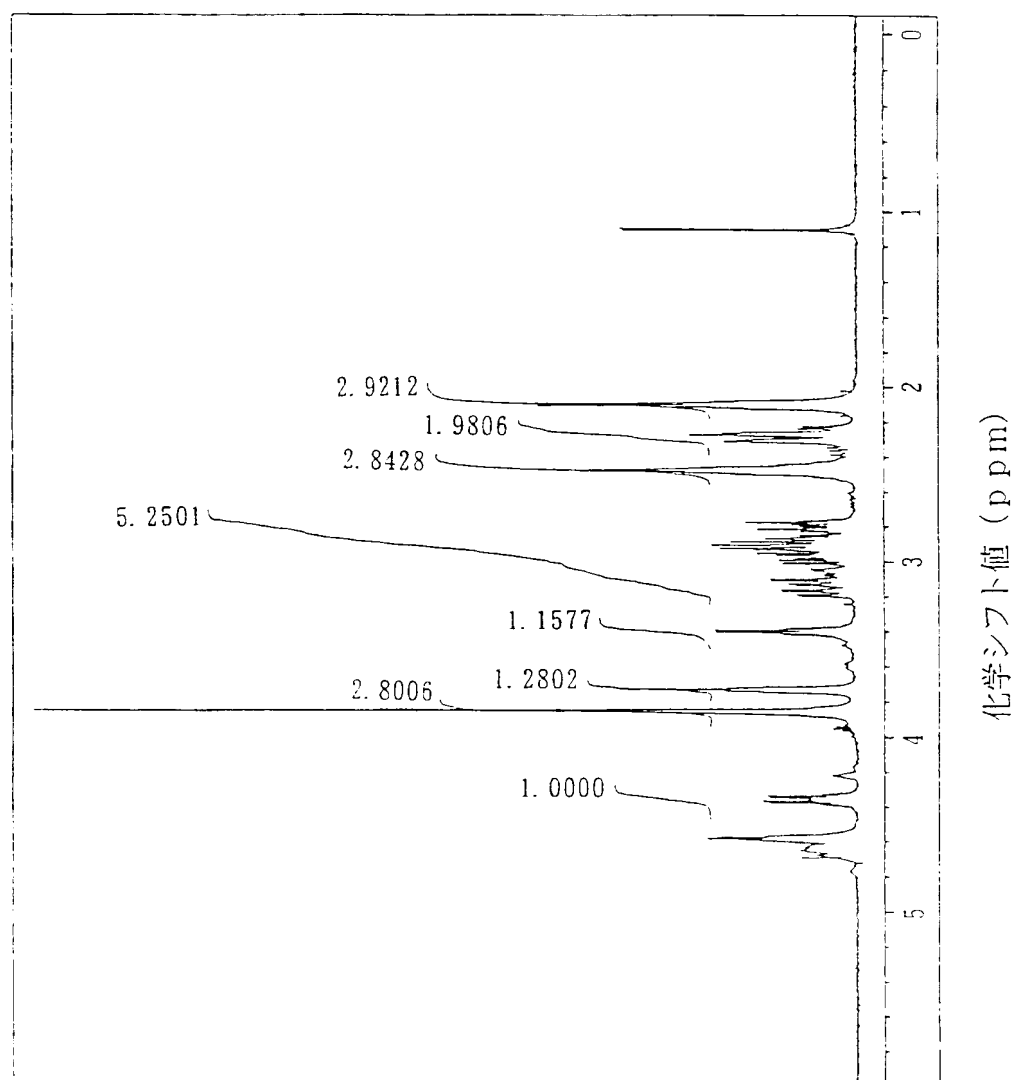
図 1 2



シグナルの強度



図 1 3

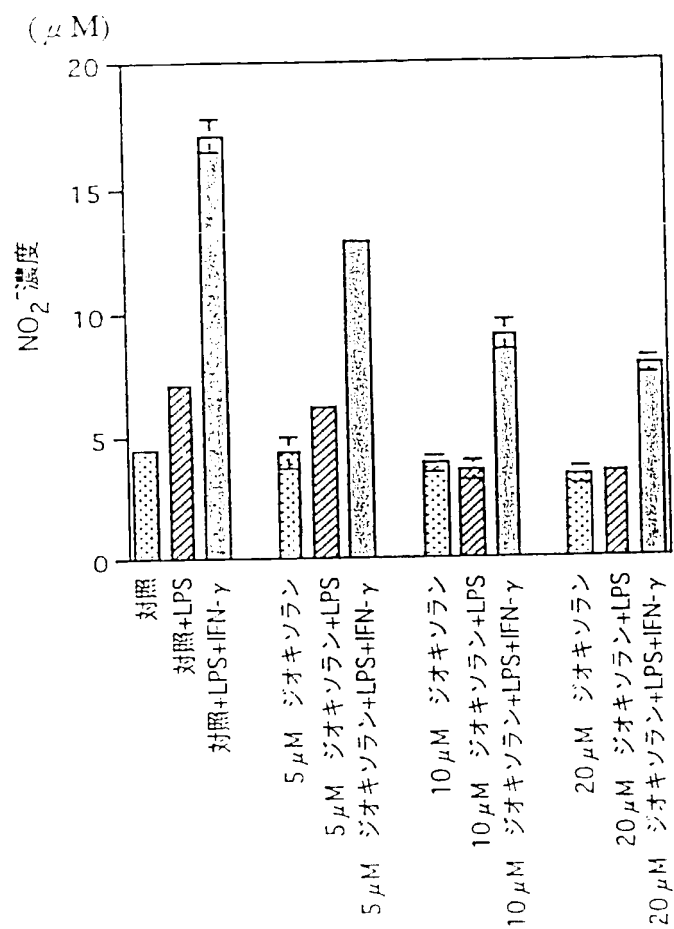


シグナルの強度





図 1 4





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00109

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>8</sup> C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>8</sup> C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/21443, A1 (Balazovsky, Mark Borisovich; Kozhemyakin, Leonid Andreevich), 19 June, 1997 (19. 06. 97) & WO, 97/21444, A1 & EP, 869809, A1	1-15
PX	WEENEN, Hugo; Van Der VEN, Jos G. M.; Van Der LINDE, Leendert M.; Van DUYNHOVEN, John; GROENEWEGEN, Anneke, "C4, C5, and C6 3-deoxyglycosones: structures and reactivity", Spec. Publ. - R. Soc. Chem. 1998, 223 (Maillard Reaction in Foods and Medicine), p.57-64	11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier document but published on or after the international filing date

"I"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Date of the actual completion of the international search:

13 April, 1999 (13. 04. 99)

Date of mailing of the international search report

27 April, 1999 (27. 04. 99)

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C07C47/263, C07C49/707, C07C45/52, C07C45/59, C07C323/22, C07D473/18, C07D473/34, A23L1/30, A23L2/00, A61K31/12, A61K31/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/21443, A1 (Balazovsky, Mark Borisovich; Kozhemyakin, Leonid Andreevich) 19. 6月. 1997 (19. 06. 97) & WO, 97/21444, A1 & EP, 869809, A1	1 ~ 15
PX	WEENEN, Hugo; Van Der VEN, Jos G. M.; Van Der LINDE, Leender t M.; Van DUYNHOVEN, John; GROENEWEGEN, Anneke, "C4, C5, and C6 3-deoxyglycosones: structures and reactivity", Spec. Publ. - R. Soc. Chem. 1998, 223 (Maillard Reaction in Foods and Medicine), p. 57-64	11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「B」国際出願日前の出願または特許であるか、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であっても出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以

27.04.99

国際調査機関の名称及び住所

名称

住所

〒100-0001 東京都千代田区千代田

様式PCT/ISA/210 (第2版) (2001年1月1日現在)

特許庁長官の署名 (特許庁長官)

署名

電話番号 03-3588-5111 (内線 2222)

